

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Celular**



**TESIS DOCTORAL**

**Los fibroblastos sinoviales en la patogenia de la  
angiogénesis reumatoide**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Elena Izquierdo Álvarez**

**Madrid, 2011**

ISBN: 978-84-694-7366-5

© Elena Izquierdo Álvarez, 2011

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular

**Los Fibroblastos Sinoviales en la  
Patogenia de la Angiogénesis  
Reumatoide**

Tesis Doctoral

Elena Izquierdo Álvarez

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de enfermedades inflamatorias y autoinmunes del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12), gracias al programa de ayudas predoctorales de formación en investigación del fondo de investigación sanitaria (FIS 06/586) del Instituto Carlos III (ISCIII) y a los proyectos financiados por el ISCIII (FIS 08/0316, FIS 05/060 y RD08/0075). Agradecemos la colaboración del Dr. J.D. Cañete (Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS), del Dr. F.J. Blanco (Hospital Juan Canalejo, La Coruña) y del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica (Hospital 12 de Octubre, Madrid), por compartir tejidos sinoviales, del Dr. J.C. Ramírez (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC, Madrid), Dr J.C. Segovia (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, CIEMAT, Madrid) y Dr. P.M. Chumakov (Cleveland Clinic Foundation, EEUU) por compartir sus construcciones lentivirales, y del Dr. David Lora y Dr. Javier de la Cruz (Unidad de Epidemiología Clínica, Hospital 12 de Octubre) por su ayuda en los análisis estadísticos.



## AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta aquí ha sido posible gracias a muchas personas. Para no dejarme a nadie empezaré desde el principio.

En el tercer año de carrera empecé a tener curiosidad por el mundo de la investigación y Margarita (mi profesora de Citología) me puso en contacto con Rosa y el grupo VIP. Gracias a ellos encontré mi vocación y sobretodo, he conocido a gente extraordinaria. Gracias: Rosa, Javier, Yasmina, M<sup>a</sup> Carmen, Cata, Irene, Alicia, Rebeca y Selene.

Cuando me licencié tenía claro que quería continuar con la investigación en inmunología y Rosa habló con José Luis Pablos, del Hospital 12 de Octubre, que buscaba alguien para una beca. Y así comenzó mi etapa predoctoral. Los primeros meses no podía creer todo lo que estaba aprendiendo. Además, tuve la suerte de ser *la estudiante* y amiga de Cata. Gracias Cata por todo lo que me enseñaste y porque todavía puedo contar contigo.

Con Cata sólo estuve 3 meses, así que imaginar lo que significan para mí las personas con las que he estado trabajando durante estos 4 últimos años, mis compañeros y también amigos, que han aguantado mis *tontunas* y que me han ayudado en TODO. No creo que me merezca todo lo que habéis hecho por mí. Muchas gracias Manu, Elena, Alicia, María J., Vanessa, María G., Gabriel, Javi, y a las *exreumáticas* Bego, Mónica y Sara. Y a Vanesa (onco) que es casi de Reuma. En estos últimos meses habéis sido imprescindibles dándome el último empujón para terminar esta tesis.

Especialmente tengo que dar las gracias a José Luis. Su forma de trabajar y de llevar el grupo hace posible que todo funcione tan bien. Muchas gracias por haberme dado esta oportunidad.

Además de mis compañeros de grupo, he compartido buenos momentos con todas las personas que han pasado por el centro de investigación, que no voy a nombrar una a una (por los árboles) y porque sabéis quien sois. Ánimo a la Alianza Rebelde!

Entre el mundo de la investigación y el mundo real, tengo que dar las gracias a mis xiques, Mar y Mireia, por aconsejarme y cuidarme tanto.

Por supuesto, nada de esto hubiera pasado si hubiera hecho caso a mis padres que querían que estudiar medicina, derecho o económicas, algo con futuro. Pero no pusieron pegas con mis elecciones, y de alguna forma, sin saber de que va esto de la investigación, creen en mí. Tampoco hubiera llegado hasta aquí sin mis hermanas, Angie y Cris, porque ellas me entienden y me ayudan a entender. Gracias a los cuatro y a Dani y Yago.

Entre toda la gente que me conoce, a los que más ilusión hace que sea doctora son mis amigos, no se porque, pero tienen más ganas que llegue este día que yo. Gracias Carol, Elena, Laura, Mano, Irene, Joss, Elia, Gotxo y Noe por “liarme” cada fin de semana para desconectar del mundo científico.

Y ya van casi dos folios, no se me da bien expresarme ni sintetizar, por suerte a veces es posible comunicarse con pocas palabras.

Gracias Javi, porque aunque pienses que no has hecho nada para ayudarme con la tesis, me has dado tranquilidad, risas y tiempo para terminarla.

Y por último, gracias a Lucas que es el único que se ha quedado conmigo todos los fines de semana mientras escribía la tesis.

I. INTRODUCCIÓN .....	1
1 Artritis reumatoide.....	3
1.1 Sinovitis reumatoide .....	5
1.2 Anomalías celulares en la artritis reumatoide.....	7
1.2.1 Células T.....	7
1.2.2 Células B .....	8
1.2.3 Células residentes .....	9
1.3 Los fibroblastos en la artritis reumatoide .....	9
1.4 Producción de moléculas efectoras.....	11
1.4.1 Moléculas de adhesión y proteasas de matriz.....	11
1.4.2 Quimioquinas .....	12
1.4.3 Citoquinas.....	13
2 Angiogénesis .....	15
2.1 Células endoteliales y pericitos .....	15
2.2 Angiogénesis en la artritis reumatoide .....	16
3 La hipoxia y el factor de transcripción inducible por hipoxia.....	18
3.1 El factor de transcripción inducible por hipoxia .....	18
3.2 HIF en la artritis reumatoide.....	20
II. OBJETIVOS .....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1 Pacientes .....	29
2 Cultivos celulares .....	31
3 Métodos histológicos.....	32
3.1 Histología .....	32
3.2 Inmunodetección .....	32
4 Implantes de fibroblastos humanos en ratones inmunodeficientes .....	35
5 Transducción de fibroblastos con partículas lentivirales.....	36
5.1 Vectores lentivirales utilizados.....	36
5.2 Transfección de células HEK293T por precipitación con CaCl <sub>2</sub> .....	37

5.3	Transducción de fibroblastos con lentivirus.....	37
6	Western blot.....	38
7	PCR cuantitativa a tiempo real .....	38
8	Análisis estadístico .....	39
IV.	RESULTADOS.....	41
1	Expansión de los fibroblastos en la sinovial reumatoide.....	43
1.1	Validación de hsp47 como marcador específico de fibroblastos sinoviales. .	43
1.2	Cuantificación del área fibroblástica en tejidos sinoviales.....	47
1.3	Correlaciones clínico-patológicas de la hiperplasia sinovial.....	48
1.4	Efectos de la terapia anti-TNF- $\alpha$ sobre la hiperplasia de los fibroblastos sinoviales .....	50
2	Cambios vasculares en la sinovial reumatoide .....	52
2.1	Densidad y estructura vascular en tejidos sinoviales reumatoides .....	52
2.2	Correlaciones clínico-patológicas de la presencia y densidad de vasos inmaduros en tejidos sinoviales reumatoides .....	54
2.3	Efectos de la terapia anti-TNF- $\alpha$ sobre los vasos sanguíneos maduros e inmaduros .....	58
3	Fenotipo pro-angiogénico de los fibroblastos reumatoides.....	59
3.1	Inducción de angiogénesis y reclutamiento de células mieloides por fibroblastos inflamatorios en ratones inmunodeficientes.....	59
3.2	Aumento de la expresión de VEGF por hipoxia en fibroblastos sinoviales...	61
3.3	Inhibición de la angiogénesis y el reclutamiento celular inducido por fibroblastos inflamatorios por antagonistas de VEGF o CXCL12.....	63
3.4	Inhibición de la angiogénesis y el reclutamiento celular inducido por fibroblastos inflamatorios por antagonistas o siRNA de HIF. ....	64
V.	DISCUSIÓN.....	67
1	Expansión de los fibroblastos en la sinovial reumatoide.....	69
2	Cambios vasculares en la sinovial reumatoide .....	71
3	Fenotipo pro-angiogénico de los fibroblastos reumatoides.....	74



4 Factores moleculares implicados en el fenotipo pro-angiogénico de los fibroblastos sinoviales inflamatorios.....	75
VI. CONCLUSIONES .....	77
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	81
VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL	103



## I. INTRODUCCIÓN

---



## 1 ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por una inflamación crónica que afecta fundamentalmente a las articulaciones, destruyendo su estructura y produciendo deformidad y una severa discapacidad funcional [1]. La etiología de la AR es multifactorial, incluyendo factores genéticos y ambientales. Actualmente no existe una hipótesis única que incluya todos los factores conocidos e integre todos los mecanismos patogénicos involucrados. La fisiopatología de esta enfermedad se basa en la activación anómala de procesos implicados en la respuesta inmune adaptativa e innata, y de efectores de la respuesta inflamatoria. Además, hay una alteración de los elementos celulares residentes de la membrana sinovial, que en conjunto se comportan de forma pseudotumoral, invadiendo y destruyendo los tejidos contiguos (hueso y cartílago).

La prevalencia mundial de AR oscila entre 0,3-1,2%. En España afecta al 0,5% de la población adulta [2-5]. La AR es tres veces más frecuente en mujeres que en hombres, y su comienzo puede ocurrir a cualquier edad, aunque es más habitual entre los 40 y 60 años [6].

En la AR, tanto la susceptibilidad como la severidad están influidas por múltiples genes. En los últimos años la lista de *loci* de riesgo para la AR se ha incrementado rápidamente (Tabla I.1). En general son genes relacionados con la inmunidad, principalmente con mecanismos de presentación antigénica y activación de células T. La principal asociación genética en la AR está relacionada con determinados alelos del gen HLA (antígeno leucocitario humano) de clase II DRB1, como DR4 y DR1, que comparten una secuencia de aminoácidos similares a “glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina” (QKRAA) [7]. Esta secuencia, denominada epítipo compartido, se sitúa en el dominio implicado en la presentación de antígenos al receptor de las células T (TCR).

Además, los estudios familiares que calculan la heredabilidad sugieren que existe un importante componente ambiental del que se conocen muy pocos factores [8]. Diversos trabajos relacionan la AR con múltiples patógenos pero no existen pruebas epidemiológicas ni microbiológicas sólidas de su implicación [9-11]. El principal factor de riesgo ambiental es el hábito de fumar. Algunos trabajos han confirmado la asociación entre este hábito y la presencia de anticuerpos anti-péptido citrulinado (ACPA) en

pacientes con AR, especialmente en individuos que tienen el epítipo compartido [12]. Para otros investigadores esta asociación es independiente de la presencia de anticuerpos [13].

**Tabla I.1. Genes de riesgo asociados a la artritis reumatoide**

Genes	Odds Ratio (IC 95%)	Función
<i>HLA-DRB1</i>	2,8 (2,73–3,03)	Respuesta células T (Presentación de antígenos)
<i>PTPN22</i>	1,94 (1,81–2,08)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>TNFAIP3</i>	1,40 (1,24–1,58)	Respuesta inflamatoria efectora (Citoquinas/NFκB)
<i>IRF5</i>	1,25 (1,14–1,37)	Inmunidad innata (DC IFN-α)
<i>RBPJ</i>	1,18 (1,12–1,24)	Inmunidad innata (DC)
<i>STAT4</i>	1,16 (1,10–1,23)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>TRAF1, C5v</i>	1,13 (1,08–1,18)	Respuesta inflamatoria efectora (TNF/ICs)
<i>CD2, CD58</i>	1,13 (1,07–1,19)	Respuesta células T (Sinapsis inmunológica)
<i>REL</i>	1,13 (1,07–1,18)	Múltiples procesos (NFκB)
<i>FCGR2A</i>	1,13 (1,06–1,21)	Respuesta inflamatoria efectora/Inmunidad innata (ICs)
<i>SPRED2</i>	1,13 (1,06–1,21)	Desarrollo mieloide
<i>PXK</i>	1,13 (1,04–1,23)	No conocida
<i>BLK</i>	1,12 (1,07–1,18)	Respuesta células B
<i>AFF3</i>	1,12 (1,07–1,17)	Desarrollo linfoide
<i>CD28</i>	1,12 (1,06–1,18)	Respuesta células T (Coestimulación células T)
<i>CCR6</i>	1,11 (1,06–1,16)	Tráfico celular (Th17)
<i>PRDM1</i>	1,10 (1,05–1,16)	Respuesta células B
<i>CCL21</i>	1,10 (1,05–1,16)	Tráfico celular ( <i>Homing</i> linfoide)
<i>IL2RB</i>	1,09 (1,03–1,15)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>IL2RA</i>	0,92 (0,87–0,97)	Respuesta células T (Presentación de antígenos)
<i>TAGAP</i>	0,91 (0,87–0,96)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>KIF5A, PIP4K2C</i>	0,91 (0,87–0,96)	No conocida
<i>IL2, IL21</i>	0,90 (0,84–0,95)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>TNFRSF14</i>	0,89 (0,85–0,94)	Respuesta células T
<i>TRAF6</i>	0,88 (0,83–0,94)	Respuesta inflamatoria efectora (Citoquinas/NFκB)
<i>PTPRC (CD45)</i>	0,88 (0,82–0,94)	Múltiples procesos (Estirpe mieloide/linfoide)
<i>CTLA4</i>	0,87 (0,83–0,91)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>PRKCQ</i>	0,87 (0,82–0,92)	Respuesta células T (Activación células T)
<i>CD40</i>	0,85 (0,80–0,90)	Respuesta células T (Coestimulación células T)
<i>IL6ST</i>	0,85 (0,78–0,93)	Respuesta inflamatoria efectora (Receptor IL6)

Modificado de un meta-análisis de estudios de genoma completo que incluyen 5539 casos de pacientes AR seropositiva y 20169 controles [14]. NFκB: factor nuclear κB, DC: células dendríticas, IFN: interferón, ICs: inmunocomplejos, TNF: factor de necrosis tumoral.

## 1.1 Sinovitis reumatoide

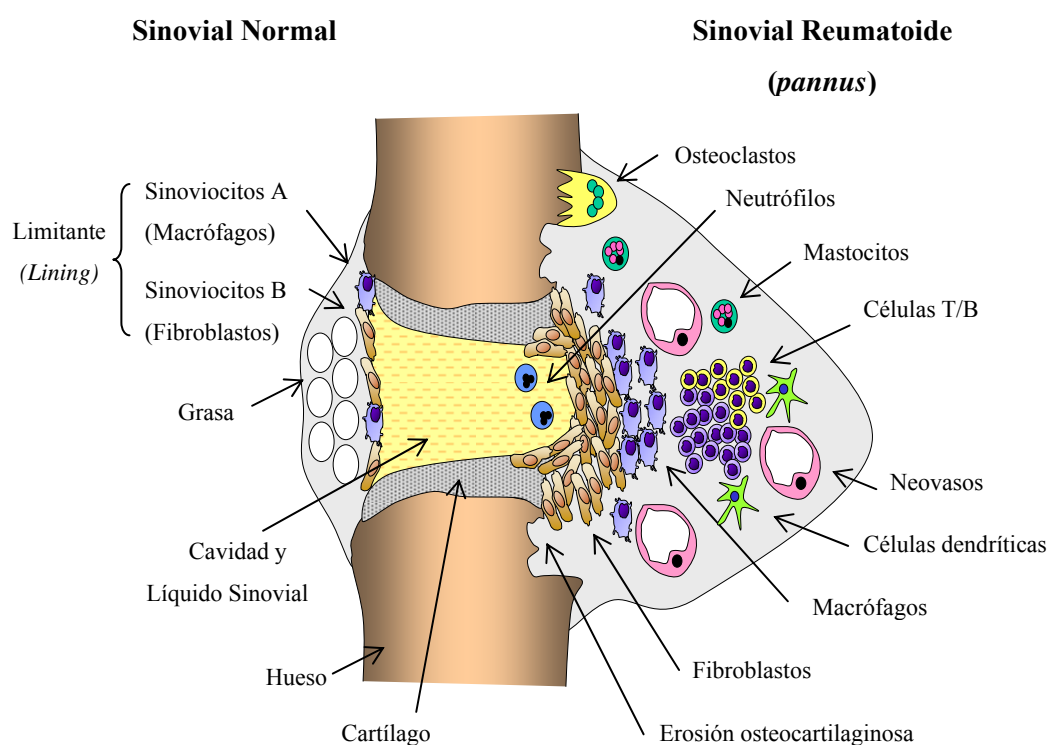
En la artritis, la estructura anatómica primariamente afectada es el tejido o membrana sinovial, una estructura especializada que tapiza la cavidad sinovial de las articulaciones diartrodiales. La membrana sinovial elabora el líquido articular que lubrica y nutre al cartílago, y que además puede regular la presión y la temperatura local. La membrana sinovial esta dividida en dos capas: una capa íntima superficial limitante (*lining*), de una o dos capas celulares de grosor y una capa menos definida de tejido conectivo vascularizada e innervada (*sublining*) [15] (Figura I.1). Ambas capas no están separadas por una membrana basal y constituyen una estructura similar a los mesotelios. El *lining* está formado fundamentalmente por dos tipos celulares denominados sinoviocitos de tipo A o macrófagos sinoviales (MLS, *macrophage-like-synoviocyte*) y de tipo B o fibroblastos sinoviales (FLS, *fibroblast-like-synoviocyte*). Los MLS son células fagocíticas con las mismas características que los macrófagos residentes en otros tejidos conjuntivos. Los FLS tienen normalmente funciones sintéticas, relacionadas con la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) y secretan los componentes esenciales del líquido sinovial [16].

En condiciones normales, la membrana sinovial posibilita el movimiento indoloro de la articulación. En la AR, la membrana sinovial experimenta una serie de transformaciones. La lesión más temprana consiste en un cambio microvascular y en un incremento en el número de células de revestimiento o *lining* sinovial (hiperplasia). El importante crecimiento de la membrana sinovial se denomina *pannus* (paño), ya que forma una masa de tejido que se superpone e invade la superficie del cartílago y del hueso. Conjuntamente se produce una infiltración de células mononucleares alrededor de las zonas vasculares [17-18].

Los neutrófilos son el componente predominante en el líquido sinovial, mientras que las células T y macrófagos, junto con un menor número de células B, plasmáticas, dendríticas y mastocitos, se acumulan en el *sublining* sinovial [19]. Los infiltrados celulares se organizan en el tejido sinovial de diferentes formas, bien de forma difusa, o bien en forma de agregados perivascuales, que en algunos pacientes muestran una disposición y microestructura similar a la de los folículos linfoides. No se conoce completamente el significado clínico de estas diferentes formas. Los agregados foliculares contienen vasos especializados en el reclutamiento de células T y B, denominados vénulas endoteliales altas, además de células dendríticas y foliculares

dendríticas capaces de presentar antígenos [20]. Estas organizaciones parecen competentes como centros germinales y en su proximidad pueden detectarse células plasmáticas específicas de péptidos citrulinados [21].

Los elementos celulares residentes en la membrana sinovial parecen también importantes en la patogenia. Los fibroblastos sinoviales presentan un fenotipo activado, produciendo factores promotores de la inflamación y de la destrucción del hueso y cartílago adyacentes [22]. Los vasos también sufren una expansión (angiogénesis) y activación de las células endoteliales (CE), que parecen contribuir a la inflamación crónica. La contribución patogénica del aumento de la vascularización es desconocida. Diferentes hipótesis plantean su posible contribución a la nutrición y crecimiento del tejido sinovial hiperplásico o al aumento del lecho de adhesión y reclutamiento de células inflamatorias procedentes del torrente circulatorio [23].



**Figura I.1. Esquema general de una articulación sinovial.** Estructura y elementos celulares presentes en la sinovial normal y cambios observados en la sinovitis reumatoide [24].



## 1.2 Anomalías celulares en la artritis reumatoide

La patogenia de la AR se entiende actualmente como un proceso que implica tanto a elementos de la respuesta inmunológica innata como de la adaptativa, aunque las relaciones entre todos los componentes y su importancia relativa no se conocen completamente. Puesto que los factores genéticos apuntan fundamentalmente a la participación de mecanismos de presentación antigénica y activación T, y la enfermedad se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos, se asume generalmente que se trata de una enfermedad iniciada por un proceso autoinmune. Sin embargo, las anomalías en la respuesta innata, la perpetuación de cascadas anómalas de producción de citoquinas pro-inflamatorias y la participación de elementos celulares residentes en la sinovial como fibroblastos y endotelio, sugieren que una vez establecida la enfermedad el proceso es más complejo y no exclusivamente dependiente de una respuesta adaptativa autoinmune.

### 1.2.1 Células T

La membrana sinovial en la AR contiene gran cantidad de células T [25]. La mayoría de los modelos animales de artritis son dependientes de células T (*collagen induced arthritis* o CIA, *antigen induced arthritis* o AIA) [26-27]. Sin embargo, ha sido difícil definir el papel que éstas juegan en la AR humana, debido al desconocimiento de los antígenos que las activan y de sus mecanismos efectores. Indirectamente, el bloqueo terapéutico de la activación de las células T mediante la proteína de fusión CTLA (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4*)-Fc o abatacept ha confirmado la importancia de éstas en la patogenia de la AR humana [28].

Las células T pueden interaccionar con las células B, promoviendo la producción de autoanticuerpos. Además, las células T activadas pueden activar localmente otras células como macrófagos, fibroblastos y osteoclastos. Estas interacciones celulares son dependientes de citoquinas T y de proteínas de membrana. Clásicamente, se ha asumido que la AR es una enfermedad Th1 o mediada por células productoras de IFN- $\gamma$ . Sin embargo el IFN- $\gamma$  y otras citoquinas Th1 se detectan en la membrana sinovial de la AR a niveles muy bajos, mucho menores que otras citoquinas como el TNF- $\alpha$ , IL-1 o IL-6 [25].

Estudios recientes apuntan a la posible implicación de las células Th17 (productoras de IL-17) en la AR. La citoquina IL-17 se expresa abundantemente en la sinovial reumatoide [29-30], y tiene efectos pro-inflamatorios sobre múltiples células de la sinovial: monocitos, macrófagos, fibroblastos y osteoclastos. IL-17 estimula la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), quimioquinas y metaloproteinasas (MMPs) de la MEC [31]. Por otro lado, las células Th17 producen IL-21, que induce un aumento de IL-17 y es también un regulador importante en la producción de IgG en la respuesta humoral T-dependiente [32-33]. Las dianas celulares y los efectos biológicos de IL-17 en modelos murinos son consistentes con las hipótesis que plantean un papel clave de las células Th17 en la sinovitis y el daño articular. Sin embargo, los datos en la AR humana son hasta hoy poco claros o incluso contradictorios.

Por otra parte, el líquido sinovial de pacientes con AR está enriquecido en células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) [34-35]. Sin embargo, las células T reguladoras de sangre periférica de éstos pacientes podrían tener defectos funcionales que bloquean su capacidad de suprimir a las células T efectoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) y estos defectos parecen reversibles después del tratamiento con anti-TNF [36-37].

### **1.2.2 Células B**

Las células B desempeñan un papel crítico en la autoinmunidad porque son la fuente de los autoanticuerpos. Pueden ser presentadoras de autoantígenos a células T, y podrían contribuir a la síntesis de citoquinas o quimioquinas que potencian la activación de las células T y la inflamación. La mayoría de las células B sinoviales son células de memoria de vida larga. También existen numerosas células plasmáticas locales, potencialmente productoras de factor reumatoide o anticuerpos ACPA [38].

El factor reumatoide (FR) fue el primer autoanticuerpo conocido, y por tanto la AR fue la primera enfermedad considerada autoinmune posiblemente mediada por autoanticuerpos [39]. Posteriormente se ha descrito la presencia de los anticuerpos ACPA que reconocen diferentes proteínas en forma citrulinada que tienen en común la transformación enzimática (deiminación) de sus residuos arginina a citrulina [40]. La mayoría de las asociaciones genéticas se han identificado predominantemente en individuos con AR seropositivos para anticuerpos ACPA o FR. La estrecha relación entre alelos HLA de susceptibilidad y la producción de anticuerpos ACPA (los más específicos

de la AR) sustentan la importancia de las células T y B en la patogenia de esta enfermedad.

Los LB del tejido sinovial muestran también otras especificidades como colágeno tipo II, ADN, toxoide tetánico, antígenos mitocondriales y proteínas de choque térmico bacterianas; aunque la contribución de estos anticuerpos es de momento hipotética [41-43].

La depleción de células B mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de las células B (anti-CD20 o rituximab) es una de las terapias actualmente utilizadas en la AR [44].

### **1.2.3 Células residentes**

Los cambios en las células residentes de la sinovial parecen contribuir también a la patogenia de la AR. En condiciones normales la función principal de éstas células es la homeostasis de los tejidos articulares. Sin embargo, en la AR estas células se activan y parecen contribuir a numerosos procesos relacionados con las respuestas inmune e inflamatoria y la destrucción articular.

## **1.3 Los fibroblastos en la artritis reumatoide**

El fibroblasto es una célula ubicua que deriva de células primitivas mesenquimales CD45 negativas y pluripotentes. Es una célula residente en el tejido conectivo que sintetiza los componentes de la MEC necesarios para la homeostasis y para la reparación de lesiones. Los fibroblastos son morfológica y funcionalmente heterogéneos, con diversos fenotipos dependiendo de su localización y del estado tisular. Se suelen identificar por su morfología en forma de huso, su capacidad de adherencia en cultivo y la ausencia de marcadores de otras estirpes celulares.

Los fibroblastos de la AR muestran un fenotipo característico que se ha comparado en determinados aspectos al de algunas células tumorales [45]. Pueden crecer sin adherirse y escapar a la inhibición por contacto como las células transformadas. Se ha intentado explicar su crecimiento excesivo por la expresión de oncogenes implicados en la regulación del ciclo celular o por el reclutamiento activo de precursores [46-47].

Además, estos fibroblastos parecen más resistentes a la muerte celular por apoptosis [48-51].

Numerosas pruebas demuestran la implicación patogénica de los fibroblastos en el desarrollo de artritis [52-53]. Los fibroblastos responden a citoquinas, especialmente TNF- $\alpha$ , produciendo una gran variedad de mediadores inflamatorios y de destrucción tisular. Además, el fenotipo alterado de los fibroblastos persiste *ex vivo* en ausencia de estímulos exógenos [54]. Diversos trabajos han intentado explicar estas variaciones fenotípicas de los fibroblastos, bien por mutaciones detectadas en genes reguladores del ciclo celular, proliferación y apoptosis [55] o bien por modificaciones epigenéticas [56]. En los fibroblastos de la AR hay una reducción de la metilación global del DNA *in situ* e *in vitro* [57]. Además, se puede obtener un fenotipo similar al de los fibroblastos de la AR desde fibroblastos normales si éstos se cultivan en un ambiente hipometilante. Asimismo, se ha detectado hiperacetilación de histonas [56] y cambios en la expresión de microRNAs específicos [58-59].

Tanto la respuesta inducida por citoquinas como los cambios fenotípicos conducen a un aumento en la síntesis de quimioquinas, citoquinas, factores pro-angiogénicos y factores relacionados con la invasión y destrucción tisular.

Los fibroblastos se expanden en la capa del *lining* sinovial, observándose un crecimiento anómalo que da lugar a la hiperplasia de la membrana sinovial y al *pannus* [60-61]. Aunque la hiperplasia de los fibroblastos ha sido descrita morfológicamente, no se existen datos cuantitativos debido a la falta de marcadores fiables. Algunos de los marcadores conocidos para estas células como VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), cadherina-11 o CD55 se modifican con el estado de la enfermedad, la diferente localización de los fibroblastos en la membrana sinovial o la exposición a citoquinas [62-68]. Los marcadores de linaje fibroblástico como las prolil-hidroxilasas o Thy1 también tienen limitaciones de especificidad y sensibilidad [69-71]. Esta carencia de marcadores específicos de fenotipo explica la falta de datos cuantitativos sobre los cambios potenciales de los fibroblastos en relación a la actividad inflamatoria en la AR o después del tratamiento.

Recientemente se ha demostrado que la detección inmunohistoquímica de la chaperona específica de colágeno hsp47 es un método altamente específico y sensible para identificar y cuantificar fibroblastos en tejidos sanos y patológicos humanos [71-72]. Los

fibroblastos expresan hsp47 de forma constitutiva e independiente de su estado de activación. Sin embargo, los macrófagos, las células vasculares y las de músculo liso no lo expresan. La utilización de este marcador para generar información cuantitativa sobre la dinámica de los fibroblastos a lo largo del curso de la enfermedad o tras la terapia en pacientes con AR es uno de los objetivos del presente estudio.

## 1.4 Producción de moléculas efectoras

### 1.4.1 Moléculas de adhesión y proteasas de matriz

La destrucción de cartílago y hueso son características de la AR. Los osteoclastos son los principales efectores de la destrucción ósea, mientras que los fibroblastos son los responsables iniciales del daño al cartílago, un proceso con varias etapas donde es necesaria su adhesión al cartílago y la síntesis de las enzimas que degradan la MEC.

Las moléculas de adhesión, especialmente integrinas, facilitan el anclaje de los fibroblastos a los componentes del cartílago. Los fibroblastos en cultivo expresan elevadas cantidades de varios tipos de integrinas  $\beta 1$ . *In vitro*, es posible inhibir parcialmente la unión de los fibroblastos al cartílago mediante anticuerpos anti- $\beta 1$ . Además, la unión de integrinas modula varias señales intracelulares relevantes en la AR, incluyendo MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) y Ras, e induce la expresión de MMPs [73]. En los cultivos de fibroblastos de AR se puede detectar e inducir la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 (*inter cellular adhesion molecule 1*) [74]. El aumento en la expresión de estas moléculas también se ha relacionado con la adhesión leucocitaria a las CE y su migración en la AR [75-77]. Además, los niveles de ICAM-1 soluble correlacionan con la severidad clínica y la progresión de AR [78-79].

Por otra parte, se piensa que la molécula de adhesión intercelular cadherina-11, además de ser responsable de la formación del *lining* sinovial, tiene un papel relevante en la destrucción cartilaginosa aunque su mecanismo exacto no se conoce [80].

Los fibroblastos del *lining* son considerados los principales efectores de la destrucción del cartílago en la AR debido a su capacidad de producir grandes cantidades de proteasas de la matriz extracelular del cartílago entre las que destacan las MMPs, catepsinas y agrecanasas [53, 81]. Entre todas las MMPs, las collagenasas (MMP-1, MMP-13) y la estromelisina (MMP-3) son especialmente importantes en la AR [82-83]. Su síntesis y

activación es inducida por varios factores, incluyendo citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ ), factores de crecimiento, ligandos de TLR (*toll-like receptors*) o especies reactivas de oxígeno [84-85]. Los fibroblastos en cultivo también producen las proteínas inhibitoras de las MMPs como los TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*) [86]. Las catepsinas son proteasas de amplia especificidad y son también reguladas por citoquinas y protooncogenes [81]. Las agrecanasas son mediadores claves de la destrucción cartilaginosa y algunas son constitutivamente expresadas por fibroblastos en cultivo (ADAMTS-4 y -5) [87].

La destrucción ósea articular está mediada enteramente por los osteoclastos, únicas células capaces de erosionar el hueso [88]. El desarrollo de los osteoclastos es dependiente de la diferenciación de sus precursores mononucleares, posiblemente reclutados desde la circulación a la sinovial. La pérdida ósea está regulada por el sistema RANK/RANK-L (receptor activador de NF- $\kappa$ B y su ligando). Los precursores osteoclásticos expresan el receptor RANK que se activa mediante la unión de su ligando RANK-L, presente exclusivamente en los LT activados y en los fibroblastos sinoviales. RANK-L es una proteína de membrana, miembro de la familia de TNF, y tanto la forma soluble como la anclada a la superficie son agonistas de la osteoclastogénesis [89-90].

#### 1.4.2 Quimioquinas

En pacientes con AR se han detectado niveles elevados de varias quimioquinas y sus respectivos receptores. Los fibroblastos de la AR pueden producir quimioquinas de forma constitutiva o después de ser estimulados con citoquinas pro-inflamatorias, micropartículas, hipoxia, ligandos de TLR o con otras quimioquinas. De esta forma, los fibroblastos de la AR contribuyen al reclutamiento y retención de células inflamatorias.

Las células T constituyen el 30-50% de las células de la membrana sinovial reumatoide y son principalmente de tipo CD4<sup>+</sup> con fenotipo Th1. La presencia de células T en la membrana sinovial es debida principalmente a la alta expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 en células T y a la presencia de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )/CCL3 y la proteína reguladora de la activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES)/CCL5 en la membrana sinovial (ambas producidas por fibroblastos en cultivo). Las quimioquinas CXCL12/SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) y CXCL16 producidas por los fibroblastos también contribuyen a la retención de las

células T. La unión de CXCL12 a CXCR4 promueve la migración direccional de las células a través de la formación de gradientes haptotácticos, lo que puede favorecer la acumulación de células T de memoria en la articulación inflamada [91-95].

Los fibroblastos sinoviales también parecen la fuente principal de quimioquinas de reclutamiento o *homing* linfoide (CXCL13, CCL21, CCL19), normalmente sólo presentes en órganos linfoides secundarios, y que aquí se asocian a la formación de estructuras linfoides terciarias (neogénesis linfoide) anteriormente descritas [96-97].

Los fibroblastos estimulados con IL-1 o TNF- $\alpha$  producen numerosos factores quimiotácticos para monocitos y macrófagos, contribuyendo al reclutamiento de estos tipos celulares a la articulación inflamada. Algunos ejemplos de estas quimioquinas son RANTES, la proteína inducible por interferón-10 (IP-10)/CXCL10, ENA-78, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)/CCL2, MIP-1 $\alpha$  y la MIP-1 $\beta$ /CCL2 [53].

Además, algunas quimioquinas presentes en la AR podrían estar implicadas en la angiogénesis de la membrana sinovial como IL-8/CXCL8, ENA-78, el oncogén de crecimiento  $\alpha$  (gro $\alpha$ )/CXCL1, CXCL12, la proteína activadora de tejido conectivo III (CTAP-III)/CXCL7, MCP-1 y fractalquina/CXC3CL1 [98-100].

### 1.4.3 Citoquinas

Otro grupo de factores implicados en la sinovitis son las citoquinas pro-inflamatorias, producidas principalmente por macrófagos (TNF- $\alpha$ , IL-1) y fibroblastos (IL-6). Los principales efectos de estas citoquinas incluyen la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión en CE y de múltiples quimioquinas y MMPs de la osteoclastogénesis. Como resultado final los leucocitos y linfocitos migran a la articulación y se produce la degradación del cartílago y el hueso.

La mayoría de las citoquinas clásicas implicadas en la AR son producto de los macrófagos pero los fibroblastos del *lining* son los principales productores de IL-6. Estudios recientes demuestran que la inhibición de IL-6 (tocilizumab) es una terapia eficaz de la AR [101]. Los fibroblastos de la AR en cultivo producen espontáneamente IL-6 y esta producción puede aumentar con la presencia de IL-1 o TNF- $\alpha$ . La neutralización de TNF- $\alpha$  en los pacientes AR fue la primera terapia biológica eficaz en el control de la inflamación crónica y de la degradación del cartílago y hueso en la AR. Sin

embargo, ninguno de estos tratamientos tiene un efecto curativo definitivo, por lo que se considera que hay otros factores que contribuyen a perpetuar la enfermedad.

IL-15 también ha sido identificada en elevadas concentraciones en los líquidos sinoviales de pacientes con AR [102-103], y los fibroblastos en cultivo de estos pacientes producen espontáneamente grandes cantidades de IL-15 [104]. En cocultivos de fibroblastos y linfocitos se ha demostrado la importancia de IL-15 en el diálogo entre ambos elementos celulares, que contribuye finalmente a la supervivencia y activación linfocitaria [105]. Otras citoquinas descritas en la AR y producidas por fibroblastos estimulados son la IL-18, IL-33 e IL-32 [106].

Los factores de estimulación de colonias de granulocitos (GM-CSF) y de macrófagos (M-CSF) son también abundantes en el tejido y líquido sinovial de pacientes con AR y son liberados principalmente por las células del *lining*. La estimulación de los fibroblastos in vitro por IL-1 o TNF- $\alpha$  aumenta de forma importante la producción de GM-CSF, lo que podría contribuir a la expansión local de los macrófagos [53].

Los fibroblastos de la AR en cultivo son una fuente importante de interferones (IFN) de tipo I que pueden tener distintas funciones inmunoactivadoras en la enfermedad. Aunque en general tienen efectos pro-inflamatorios como la liberación de quimioquinas y MMPs, en diversos modelos de artritis también se ha demostrado un papel anti-inflamatorio del IFN- $\beta$  [53]. Los fibroblastos tienen también la capacidad de producir otras citoquinas anti-inflamatorias y factores que potencialmente suprimen la sinovitis como el factor de crecimiento transformante, TGF- $\beta$ . Además, producen importantes cantidades de IL-1Ra, una proteína que compite con IL-1 por el receptor [107].



## **2 ANGIOGÉNESIS**

La formación de nuevos vasos ocurre fundamentalmente mediante los procesos de vasculogénesis y angiogénesis. En la vasculogénesis las células precursoras se diferencian en CE que posteriormente se organizarán en una red vascular, mientras que en la angiogénesis la formación de los nuevos vasos sanguíneos o neovascularización se produce a partir de otros existentes [108-110]. Durante el desarrollo embrionario los vasos se forman por vasculogénesis y angiogénesis. Sin embargo, en la vida adulta, la formación de nuevos vasos ocurre en ciertas situaciones fisiológicas como la reproducción o la reparación de tejidos y es principalmente debida a procesos angiogénicos.

El proceso de angiogénesis comienza cuando las CE de los capilares son estimuladas por factores angiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y/o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las CE proliferan y son activadas para producir enzimas proteolíticas (MMPs y activador de plasminógeno) que degradan y remodelan la matriz extracelular, facilitando su migración al estroma perivascular donde interaccionan con integrinas de la matriz [111]. Después se diferencian, cambiando a una morfología tubular o laminar hasta que se estabilizan y maduran, reclutando pericitos y células de músculo liso.

En todo este proceso se mantiene un estricto equilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis que es alterado en un amplio rango de enfermedades como cáncer, aterosclerosis, degeneración macular, e inflamación crónica (psoriasis, AR etc), dando lugar a la persistencia de la angiogénesis patológica.

### **2.1 Células endoteliales y pericitos**

Los pequeños vasos sanguíneos que componen el lecho vascular distal normal están formados por CE que constituyen la capa íntima del vaso y células perivasculares o pericitos que envuelven y estabilizan los vasos [112]. Los pericitos son células con filamentos contráctiles de actina- $\alpha$  (isoforma del músculo liso) y se localizan alrededor de la membrana basal de capilares y vénulas. Los vasos de mayor calibre tienen como células de soporte las células de músculo liso y los fibroblastos de la adventicia. Los pericitos hacen contactos focales con las CE a través de acoplamientos especializados.

Además, a través de uniones *gap* se establece contacto directo entre el citoplasma de los pericitos y las CE, permitiéndose el intercambio de iones y pequeñas moléculas [113-114]. Durante la angiogénesis las CE secretan factores que contribuyen a reclutar pericitos. El factor más importante es el factor derivado de plaquetas B (PDGF-B) que promueve la proliferación y reclutamiento de los pericitos hacia los tubos vasculares de nueva formación. Los vasos rodeados de membrana basal y pericitos son considerados vasos maduros. En el proceso tumoral, caracterizado por angiogénesis activa, se han observado vasos inmaduros con alta permeabilidad, con una estructura desorganizada que parecen contribuir al crecimiento tumoral y metastatización [115]. Estos vasos patológicos son inestables, inmaduros y carecen de membrana basal completa y pericitos. Desconocemos si este proceso ocurre en la angiogénesis asociada a la inflamación crónica y sus implicaciones patogénicas. El estudio de este aspecto es uno de los objetivos del presente trabajo.

## 2.2 Angiogénesis en la artritis reumatoide

En diversas formas de artritis crónica se ha descrito un aumento de la vascularidad sinovial y un aumento de biomarcadores de angiogénesis y factores pro-angiogénicos, por lo que se piensa que existe un proceso angiogénico muy activo en la AR, especialmente en sus fases iniciales. Los vasos de nueva formación podrían mantener el proceso inflamatorio crónico transportando células inflamatorias o supliendo con nutrientes y oxígeno el *pannus* [116-121].

Los fibroblastos producen múltiples mediadores pro-angiogénicos como VEGF, TGF- $\beta$ , IL-8 y CXCL12, que pueden inducir el reclutamiento, proliferación y activación de las CE. VEGF es el principal factor pro-angiogénico implicado en la AR debido a su capacidad mitogénica sobre las CE y sus efectos sobre la permeabilidad vascular. Los fibroblastos y macrófagos sinoviales sintetizan VEGF constitutivamente. Además, la expresión de VEGF puede incrementarse por la hipoxia o en respuesta a diferentes citoquinas [122-124]. La mayoría de las vías implicadas en la activación de los fibroblastos conducen a la síntesis de VEGF, incluyendo la estimulación con TNF- $\alpha$  e IL-17 [123, 125], la activación del TLR2 [126], la unión de CD40 [127] y la hipoxia tisular [128].

En pacientes con AR se han encontrado niveles elevados de VEGF de forma local y sistémica que correlacionan con la actividad y severidad de la enfermedad [129-131]. Los niveles de VEGF en plasma de pacientes con AR son marcadamente superiores a los de los de pacientes con artrosis (OA) o controles sanos [132]. Diversos antagonistas de VEGF han demostrado efectos terapéuticos en el modelo de artritis inducida por colágeno, identificando el proceso angiogénico como posible diana terapéutica [133-135]. Sin embargo, no hay estudios morfológicos detallados de los cambios inducidos en la artritis por esta terapia. VEGF, como regulador de la permeabilidad vascular, participa en el reclutamiento de células inflamatorias mieloides [136-138]. Por lo tanto, sus antagonistas podrían mejorar la sinovitis a través de la disminución de ambos procesos.

La angiogénesis patológica mediada por VEGF ha sido ampliamente estudiada en cáncer, donde los antagonistas de VEGF se han utilizado como terapia en clínica [139]. En la mayoría de los tumores, los vasos de nueva formación muestran diferencias con los vasos normales como una actividad alterada de receptores, moléculas de adhesión, y una pérdida de su organización jerárquica con cambios en su distribución tridimensional [140]. En el cáncer, la angiogénesis está caracterizada por vasos inmaduros que carecen de pericitos generados por un exceso de VEGF [141-142]. VEGF media la proliferación endotelial pero inhibe el desarrollo de pericitos, un proceso dependiente de la señalización por PDGF [143-144]. En diversos modelos animales de cáncer se ha observado la eliminación de los vasos inmaduros después del tratamiento con antagonistas de VEGF, mientras que los vasos maduros son relativamente estables y resistentes [141-145].

Al igual que en los tumores, en la sinovial reumatoide hay un ambiente hipóxico severo que se mantiene a pesar de una activa angiogénesis y del aumento de la vascularización, lo que sugiere un funcionamiento anómalo de los vasos de nueva formación [146-147]. Sin embargo, no ha sido investigada hasta el momento la presencia de vasos inmaduros sinoviales ni su potencial contribución al proceso patológico. La mejoría de la enfermedad en respuesta a la terapia con anti-TNF- $\alpha$  es paralela a una reducción inmediata en los niveles de VEGF y de otros marcadores pro-angiogénicos [123, 148-151]. Técnicas de imagen sugieren que la terapia efectiva disminuye el incremento de vascularidad pero no existen estudios patológicos detallados [152-154]. La persistencia de la actividad vascular correlaciona con daños al hueso y al cartílago incluso en pacientes con remisión clínica.

Por lo tanto, analizar los cambios en la estructura y densidad vascular después de la disminución indirecta de VEGF tras la terapia puede tener un valor informativo del papel potencial de la angiogénesis en la patogenia de la AR.

### 3 LA HIPOXIA Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR HIPOXIA

En diversas enfermedades, incluida la AR, se detectan anomalías en los niveles de oxígeno. El término hipoxia hace referencia a esta disminución del oxígeno, que en sangre y tejidos provoca una disfunción o incluso, muerte celular. Se postula que estas alteraciones contribuyen al proceso patológico. El factor de transcripción HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) tiene un papel esencial en el control de la homeostasis del oxígeno y su activación conduce a la expresión de múltiples genes relacionados con la angiogénesis y la adaptación metabólica a la hipoxia [155-156].

#### 3.1 El factor de transcripción inducible por hipoxia

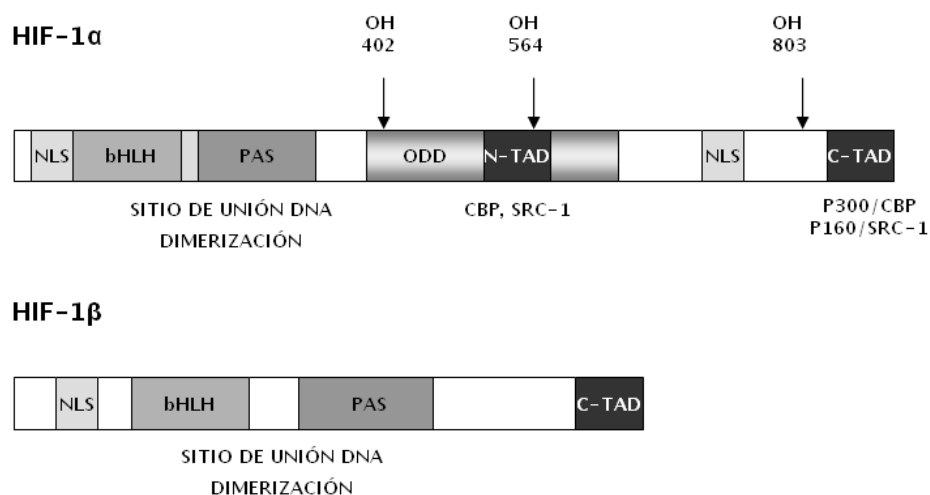
HIF-1 es un heterodímero formado por una subunidad constitutiva que se localiza en el núcleo, HIF-1 $\beta$ , también conocida como ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*); y la subunidad HIF-1 $\alpha$ , inducible por hipoxia (Figura I.2). Ambas subunidades comparten cierta homología y contienen dominios de transactivación y de degradación dependiente de oxígeno [157-159] (Figura I.2). El dímero HIF-1 $\alpha/\beta$  se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) de la región promotora de genes dependientes de oxígeno [160-161].

Además de HIF-1 $\alpha$ , se han descrito las isoformas HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  [162-165]. HIF-1 $\alpha$  está expresado de forma ubicua, sin embargo HIF-2 $\alpha$  se encuentra principalmente en las CE, células epiteliales, fibroblastos y neuronas [166-167]. Parece que ambas isoformas desempeñan papeles no redundantes [168-169].

Los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  están regulados por su grado de síntesis y estabilidad. En condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por prolin-hidroxilasas (PHDs) dependientes de oxígeno y oxoglutarato [170-171]. De esta forma, HIF-1 $\alpha$  queda marcado para su degradación vía ubiquitina-proteosoma de forma dependiente de la proteína Von Hippel-Lindau (pVHL) [172-173]. Sin embargo, en condiciones de hipoxia (HIF-1 $\alpha$  no está hidroxilado) pVHL no puede unirse y HIF-1 $\alpha$  es estable y se acumula

(Figura I.3) [174]. Los niveles de HIF-1 $\alpha$  aumentan exponencialmente cuando la célula se expone a concentraciones de oxígeno menores de 6%, con una respuesta máxima al 0,5% según el tipo celular [175-176]. La subunidad HIF-1 $\beta$  es independiente de los niveles de oxígeno. En hipoxia, HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo y dimeriza con HIF-1 $\beta$  (Figura I.3). El heterodímero se une a secuencias específicas de DNA y mediante el reclutamiento de coactivadores como p300/CBP y p160/SRC-1 transactivan los genes regulados por la hipoxia [177-179].

En normoxia, algunas citoquinas y factores de crecimiento son también capaces de estabilizar o activar a HIF-1 $\alpha$  en ensayos *in vitro*. Algunos ejemplos son TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , PDGF o FGF [180-186]. La lista de genes que se activan por HIF-1 es muy amplia, e incluye genes cuyos productos participan en angiogénesis, metabolismo energético, eritropoyesis, proliferación y viabilidad celular, apoptosis, etc [187]. Debido a su participación en estas funciones, HIF es un factor de transcripción relevante tanto en el desarrollo embrionario normal como en estados fisiopatológicos. En diversos tipos de cáncer humano se ha detectado un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  [188-189] y es frecuente la asociación de alteraciones genéticas en cáncer con un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  [190-192].



**Figura I.2. Esquema de la estructura molecular de las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ .** El extremo N-terminal contiene la señal de localización nuclear (NLS), el dominio hélice-vuelta-hélice básico (bHLH) y el dominio PAS (Per-Arnt-Sim). El extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$  contiene dos dominios de transactivación, N-TAD Y C-TAD, y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD).

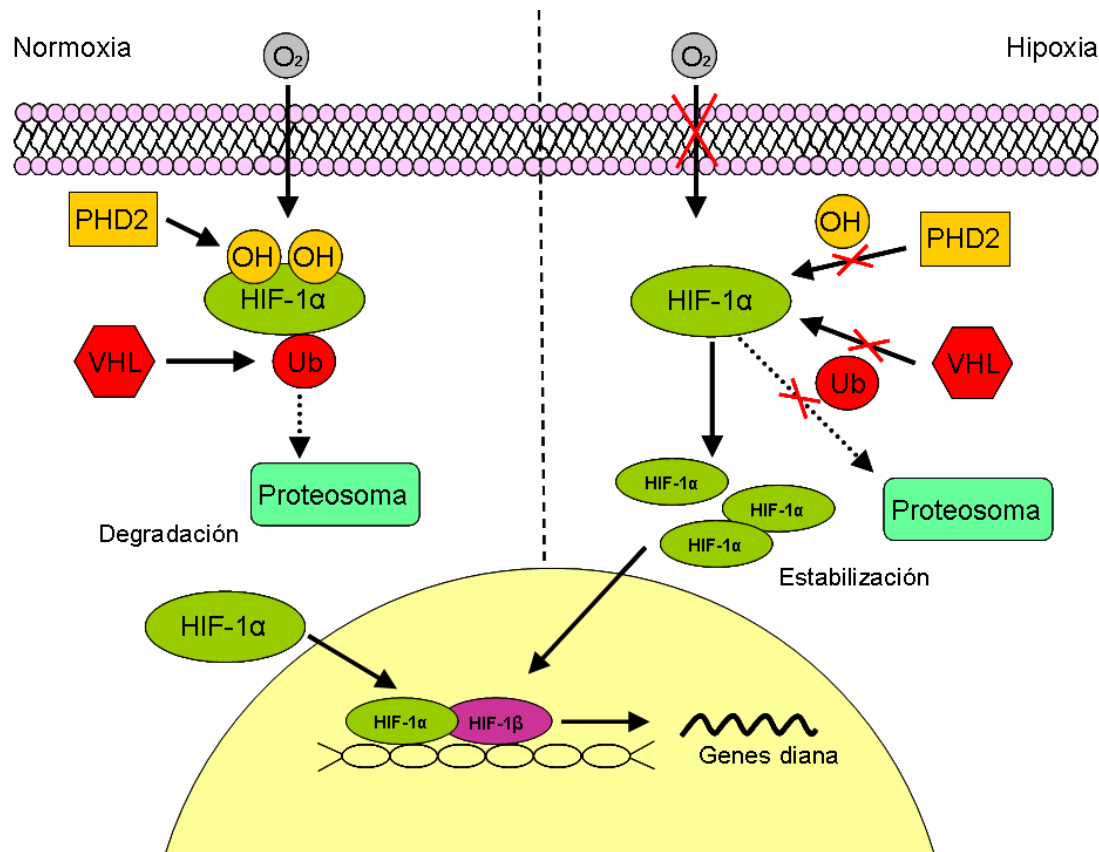


Figura I.3. Esquema de la estabilización y degradación de HIF.

### 3.2 HIF en la artritis reumatoide

En la sinovial reumatoide se ha detectado un medio severamente hipóxico. La presión media de oxígeno en el líquido sinovial en pacientes de AR es menor que la de los controles sanos (27 mm Hg y 63 mm Hg, respectivamente). Además, la presión de oxígeno correlaciona con la severidad histológica de la inflamación [193-194]. En ausencia de oxígeno, la producción de energía se mantiene por glicolisis anaerobia. En el líquido sinovial reumatoide se puede detectar un aumento de lactato y otros metabolitos glicolíticos confirmando la predominancia del metabolismo anaeróbico [194-195]. En tejidos sinoviales de pacientes con AR se observa un importante incremento en la expresión de HIF-1α en comparación con los pacientes con OA, mientras que en los individuos sanos no se detecta [196]. Se han detectado las isoformas HIF-1α y HIF-2α en los fibroblastos, macrófagos y CE de la sinovial reumatoide [196]. Además, mediadores pro-inflamatorios de la AR como TNF-α o IL-1β podrían contribuir a estabilizar o activar

HIF-1 $\alpha$  [197-199]. Se postula que estas alteraciones contribuyen a la patología pero no existen pruebas directas de este concepto.

Existen múltiples evidencias que relacionan la hipoxia con las vías pro-inflamatorias pero se desconoce la importancia que tiene la disminución de los niveles de oxígeno en la patogénesis de la inflamación crónica. Los datos más consistentes provienen de modelos animales de inflamación donde parece que HIF es un factor crítico en el inicio y perpetuación de la inflamación mediada por células mieloides [200]. La contribución de la hipoxia a las funciones pro-inflamatorias de otros tipos celulares no está clara. Hasta el momento, en los fibroblastos de la AR se han identificado pocos genes de respuesta a la hipoxia como VEGF, CXCL12, MMP-1 y -3 entre otros [201-203].

El estroma inflamatorio de la articulación en la AR presenta numerosas similitudes con el estroma tumoral, incluyendo el ambiente hipóxico severo, un aumento en la infiltración de macrófagos, el crecimiento pseudotumoral e invasivo de tejidos próximos y un incremento en la angiogénesis [100, 193-194, 201]. VEGF y la quimioquina CXCL12, son dos factores importantes de la respuesta a la hipoxia que pueden ejercer efectos sinérgicos en el reclutamiento y retención de las células mieloides, elementos celulares críticos en la respuesta angiogénica del estroma tumoral [136, 204]. VEGF es un factor importante en la activación de la MMP-9 y en consecuencia de la movilización de las células progenitoras vasculares [205], y CXCL12 parece ser crucial en la retención de la población CD45<sup>+</sup> dentro de los tumores [206]. Sin embargo, no se ha estudiado el papel que desempeñan HIF, VEGF y CXCL12 derivados de los fibroblastos en el reclutamiento de células mieloides y la inducción de angiogénesis en la membrana sinovial reumatoide, y éste representa otro de los objetivos del presente trabajo.





## **II. OBJETIVOS**

---



1. Analizar los cambios cuantitativos en el componente fibroblástico del estroma sinovial en la artritis reumatoide, comparada con la artrosis y la sinovial normal, su relación con variables clínico-patológicas y sus cambios en respuesta a la terapia anti-TNF- $\alpha$
2. Analizar los cambios en la densidad y estructura vascular en la sinovial reumatoide y artrósica, comparadas con la normal, su relación con variables clínico-patológicas y sus cambios en respuesta a la terapia anti-TNF- $\alpha$ .
3. Estudiar la capacidad intrínseca de los fibroblastos sinoviales inflamatorios (reumatoides o artrósicos) y controles no inflamatorios de inducir reclutamiento celular y angiogénesis en un modelo animal (implantes a ratones inmunodeficientes).
4. Estudiar en cultivos celulares y en el modelo animal los factores moleculares implicados en el fenotipo pro-angiogénico de los fibroblastos sinoviales inflamatorios.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1 PACIENTES

Un grupo de muestras de tejido sinovial se obtuvieron de pacientes con AR diagnosticada en base a los criterios de AR del *American College of Rheumatology* (ACR), la asociación americana de reumatismo [207], o de pacientes con artrosis, en el momento de ser intervenidos mediante sustitución protésica de cadera o de rodilla. Las muestras de tejido sinovial control se obtuvieron de donantes sanos sin historia de enfermedad articular, cuyas biopsias se examinaron histológicamente para confirmar la ausencia de infiltrado inflamatorio. Dependiendo de la finalidad de las muestras, una parte de las biopsias fue usada para obtener fibroblastos en cultivo y el resto fue fijado, bien en una solución de formalina 10% que posteriormente se incluyó en parafina o bien se congeló con nitrógeno líquido tras incluirse en OCT (*optimal cutting temperature*; Powys, Reino Unido).

Otro grupo de biopsias se obtuvieron por artroscopia en colaboración con la Unidad de Artritis del Hospital Clinic de Barcelona, IDIBAPS (Dr Juan de Dios Cañete). Para estudiar la expansión de los fibroblastos o hiperplasia sinovial se usaron muestras de 48 pacientes (Tabla III.1). El análisis de los cambios vasculares en la sinovial reumatoide se hizo a partir de las biopsias de 82 pacientes (Tabla III.1). Todos los pacientes tenían la enfermedad activa caracterizada por inflamación en al menos una rodilla. De cada paciente se obtuvo información sobre edad, sexo, duración enfermedad, DAS28 (28-*joint Disease Activity Score*), proteína C reactiva (PCR), tasa de sedimentación de eritrocitos, presencia de factor reumatoide IgM (Positivo  $\geq 30$  UI/ml, Inmunoscan, Estocolmo, Suiza), y la presencia de erosiones. De este grupo, se rebiopsió por artroscopia a los  $10 \pm 2$  meses a un subgrupo de 25 pacientes que comenzaron una terapia anti-TNF- $\alpha$  (etanercept, adalimumab o infliximab) tras la primera biopsia por tener enfermedad activa resistente a una terapia previa con DMARD (*Disease-Modifying Antirheumatic Drug*) (Tabla III.2). Todos estos pacientes también recibieron terapia con metotrexato (7,5-20mg/semana) y un 60% prednisona a dosis bajas.

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital 12 de Octubre y del Hospital Clinic de Barcelona (IDIBAPS).

**Tabla III.1 Datos clinico-patológicos de los pacientes con AR incluidos en cada estudio**

<b>Variables</b>	<b>Hiperplasia Sinovial (n=48)</b>	<b>Vascularidad Sinovial (n=82)</b>
Edad (años)	57±11	58±13
Mujeres (%)	65%	68%
Duración AR (meses)	76±104	83±100
DAS28	5,5±1,4	5,1±1,4
PCR (mg/dl)	4,26±3,46	4,02±3,43
Erosión (%)	63%	67%
Autoanticuerpos-positivos † (%)	71%	71%
CD3 <sup>+</sup> T (células/mm <sup>2</sup> )	724±43	667±466
CD20 <sup>+</sup> B (células/mm <sup>2</sup> )	259±249	226±205
CD68 <sup>+</sup> (células/mm <sup>2</sup> )	1689±1309	1643±1326
LN (%)	54%	48%

Datos de los pacientes con AR tomados en el momento de la biopsia. DAS28: valor de actividad del la enfermedad, PCR: proteína C reactiva, LN: neogénesis linfoide. (†) Autoanticuerpos FR o ACPA.



**Tabla III.2. Cambios clínico-patológicos de los pacientes con AR antes y después de la terapia anti-TNF- $\alpha$** 

	Basal	Post-terapia	P-valor	$\Delta$ Cambios No-Respondedores (n=7) #	$\Delta$ Cambios Respondedores (n=18) #
DAS28	6,0 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 1,9	<0,0001	-0,5 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 1,8
PCR mg/dl	4,8 $\pm$ 3,5	1,6 $\pm$ 2,0	0,0004	1,0 $\pm$ 4,1	4,2 $\pm$ 3,6
CD3/mm2	823 $\pm$ 88	478 $\pm$ 83	0,0064	202 $\pm$ 398	400 $\pm$ 698
CD20/mm2	322 $\pm$ 59	220 $\pm$ 54	NS	219 $\pm$ 245	56 $\pm$ 411
CD68/mm2	324 $\pm$ 38	192 $\pm$ 31	0,0091	53 $\pm$ 180	163 $\pm$ 195

Los cambios obtenidos por la terapia con anti-TNF- $\alpha$  se analizaron con el test Wilcoxon para datos pareados (basales *versus* post-terapia). #  $\Delta$  Disminución absoluta de los niveles basales en pacientes con buena o moderada respuesta EULAR (respondedores) a la terapia con anti-TNF- $\alpha$  y de los no-respondedores.

## 2 CULTIVOS CELULARES

Los cultivos de fibroblastos se establecieron a partir del crecimiento de explantes con medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con un contenido de glucosa del 4.5 g/L (Lonza, Viviers, Bélgica), y suplementado con 20 mM de glutamina (Invitrogen, Piesley, Reino Unido), una mezcla de antibióticos que contenía 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml estreptomina (Lonza) y con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Lonza). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% CO<sub>2</sub> y 21% de O<sub>2</sub> (normoxia). Para los experimentos en condiciones de hipoxia, los fibroblastos se cultivaron con una presión parcial de O<sub>2</sub> de 0,5 % en un incubador bajo condiciones anaeróbicas controladas (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>). En otras ocasiones se simuló la hipoxia químicamente tratando los cultivos con cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) 300  $\mu$ M durante 4 horas. Todos los experimentos se llevaron a cabo cuando los cultivos se encontraban entre los pases tercero y noveno.

Se cultivaron células HEK293T (línea celular humana de riñón con morfología epitelial) que fueron usadas como células empaquetadoras en los experimentos de transducción. El medio y las condiciones de cultivo fueron las mismas que con los fibroblastos.

### **3 MÉTODOS HISTOLÓGICOS**

#### **3.1 Histología**

Se realizaron estudios histológicos, inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia de las biopsias incluidas en parafina o en OCT.

Los tejidos parafinados se cortaron en un microtomo a 4 µm y se montaron en portaobjetos silenizados (Dako, CA, EEUU). Fueron desparafinados a 60 °C en un termo-bloque (Techne, Cambridge, Reino Unido), y rehidratados con xileno (MERCK, Darmstadt, Alemania) 10 minutos y alcoholes (MERCK) seriados (100%, 96%, 70%). Para los estudios inmunohistoquímicos o de inmunofluorescencia las muestras se calentaron para la recuperación de epítomos en un tampón Tris-EDTA (Sigma, Steinheim, Alemania) 1 mM pH 9 con Tween20 (Sigma) al 0,5% durante 20 minutos en microondas. Una vez atemperadas las muestras se lavaron con tampón fosfato-salino (PBS) (Invitrogen).

Las muestras congeladas en OCT se cortaron en un criostato a 6 µm y los cortes fueron montados en portaobjetos silenizados (Dako). Las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% 10 minutos a 4 °C y se lavaron con PBS.

Las tinciones para estudios histológicos, tanto en muestras parafinadas como las congeladas, se realizaron con hematoxilina (Vector Laboratories, CA, EEUU) y eosina (Sigma-Aldrich, Reino Unido) siguiendo los métodos habituales [208].

#### **3.2 Inmunodetección**

Realizados los pasos anteriores e independientemente del tipo de muestra (OCT o parafina) se detectaron los antígenos que eran objeto de nuestro estudio mediante anticuerpos específicos. La detección de los anticuerpos se llevó a cabo mediante inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia.

##### **A. Inmunoperoxidasa**

La detección de los anticuerpos por inmunoperoxidasa se realizó siguiendo el método indirecto de avidina-biotina-peroxidasa ABC (Vector). En los tejidos lavados con PBS se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) al 3% en metanol (Lab-Scan, Sowinski, Polonia) durante 10 minutos. Después se realizó un bloqueo con suero (de la misma especie animal del anticuerpo secundario) durante 30

minutos y posteriormente los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario adecuado (Tabla III.3). Se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado apropiado durante 20 minutos (Tabla III.4). Se prepararon los complejos avidina-biotina según el protocolo del producto y con ellos se incubaron las secciones durante 30 minutos. Se reveló con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) según las instrucciones del fabricante. En algunos casos las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. Por último, después de deshidratar los tejidos con alcoholes seriados (70%, 96%, 100%) y xileno, se montaron con medio Depex (VWR, Poole, Reino Unido).

En todos los experimentos se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario.

## **B. Inmunofluorescencia**

Las muestras fueron tratadas como se describió en el apartado 3.1. A continuación, las secciones se lavaron con PBS y se bloquearon con suero (misma especie del anticuerpo secundario) durante 30 minutos, y seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario adecuado (Tabla III.3). Se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario específico de isotipo (Tabla III. 2) marcado con Alexa 488 o 594 durante 1 hora. Los tejidos fueron contrateñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), se lavaron con PBS y se montaron con medio FluorSave (Calbiochem, Darmstadt, Alemania).

Se realizaron tinciones por inmunofluorescencia de fibroblastos en cultivo siguiendo el protocolo descrito para las muestras de tejidos.

En todos los experimentos se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario.

## **C. Obtención y cuantificación de los datos inmunohistoquímicos**

Se fotografió y digitalizó el área total de cada tejido con una cámara Spot RT CCD y el software Spot 4.0.4 (Diagnostic Instruments, Michigan, EEUU) sobre un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan-2 (Zeiss, Jena, Alemania). Los datos cuantitativos se obtuvieron usando el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

El área fibroblástica del *lining* se ajustó por la longitud (mm) del *lining* (área del *lining* hsp47-positiva / longitud del *lining*) y el área fibroblástica del *sublining* se ajustó por área total (área del *sublining* hsp47-positiva / área total del *sublining*).

**Tabla III.3. Anticuerpos primarios**

Nombre	Células detectadas	Clon	Isotipo	Dilución	Casa Comercial
aSMA	Pericitos, miofibroblastos, células músculo liso	1A4	Ratón anti-humano monoclonal IgG2a	1:200	Sigma Aldrich, Madrid, España
CD11b-PE	Células mieloides	M1/70	Rata anti-ratón IgG	1:2000	BD PharMingen, CA, EEUU
CD31	Células endoteliales	JC70A	Ratón anti-humano monoclonal IgG1k	1:100	Dako, Dinamarca
CD45	Células linfoides y mieloides	2B11 + PD7/26	Ratón anti-humano monoclonal IgG1k	1:50	Dako
CD68	Macrófagos	KP1	Ratón anti-humano monoclonal IgG1k	1:100	Dako
Hsp47	Fibroblastos	M16.10A1	Ratón anti-humano monoclonal IgG2b	1:100	AssayDesigns; Mi, EEUU
PECAM-1	Células endoteliales	M-20	Cabra policlonal IgG	1:200	Santa Cruz, CA, EEUU
Podoplanina	Endotelio linfático	D2-40	Ratón anti-humano monoclonal IgG1k	0,15mg/L	Zymed Laboratories, CA, EEUU

aSMA:  $\alpha$ -actina de músculo liso, PE: ficoeritrina, hsp47: proteína de choque térmico 47, HIF-1 $\alpha$ : factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$ , PECAM: molécula de adhesión celular endotelial/plaquetaria.

Tabla III.4. Anticuerpos secundarios

Isotipo	Fluoróforo	Dilución	Casa Comercial	Anticuerpo Reconocido
Cabra anti-ratón IgG	Alexa 594	1:1000	Molecular Probes, Invitrogen, OR, EEUU	Anti-CD31 Anti-Hsp47 Anti-PECAM
Cabra anti-ratón IgG1	Alexa 594	1:1000	Molecular Probes	Anti-CD45
Cabra anti-ratón IgG	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes	Anti-Hsp47
Cabra anti-ratón IgG2a	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes	Anti-aSMA
Caballo anti-ratón IgG	Biotinilado	1:200	Vector Laboratories, CA, EEUU	Anti-aSMA Anti-Hsp47 Anti-Podoplanina
Caballo anti-cabra IgG	Biotinilado	1:200	Vector Laboratories,	Anti-PECAM

#### 4 IMPLANTES DE FIBROBLASTOS HUMANOS EN RATONES INMUNODEFICIENTES

Se realizaron implantes que contenían  $0,5 \times 10^6$  fibroblastos en 500  $\mu$ l de matrigel (BD Biosciences, CA, EEUU) previamente descongelado a 4°C. Los implantes se inyectaron subcutáneamente en la espalda de ratones hembra atímicos *Nude-Foxn1nu* de 2 meses de edad (Harlan-Ibérica, Barcelona, España). En algunos casos se administró a los ratones 300  $\mu$ g de bicyclam AMD3100 (Sigma-Aldrich Química), el antagonista específico del receptor CXCR4, cada 24 horas por vía intraperitoneal (IP); o una dosis (5 mg/Kg) del anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano bevacizumab (Roche Farma S.A., Madrid, España) por vía IP simultáneamente al implante de fibroblastos. En otros casos se incorporó quetomina (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), una pequeña molécula inhibidora de las interacciones entre HIF y el cofactor transcripcional p300. La quetomina se incorporó a una dosis de 10 nM en el matrigel junto con la suspensión de fibroblastos y en los ratones control se añadió la misma cantidad del vehículo control

o DMSO (dimetil sulfóxido; Sigma Aldrich). Después de 7 días, tras sacrificar los animales se extirpó la piel que contenía el implante de matrigel.

Las muestras de matrigel fueron congeladas en nitrógeno líquido incluidas en OCT y se procesaron como se describió en el apartado 3.1. Se examinaron por tinción con hematoxilina y eosina y mediante estudios inmunohistoquímicos. Se realizaron marcajes inmunofluorescentes o por inmunoperoxidasa con los anticuerpos anti-PECAM y anti- $\alpha$ SMA. Se usaron anticuerpos secundarios, bien biotinilados o marcados con Alexa 488. Además, se realizó un marcaje directo con el anticuerpo anti-CD11b-ficoeritrina. Las muestras se contratiñeron como se explicó anteriormente. Los datos cuantitativos se obtuvieron contando el número de células (núcleos DAPI positivos) por área en imágenes digitalizadas cubriendo el área de matrigel completo y usando el software Image J.

## **5 TRANSDUCCIÓN DE FIBROBLASTOS CON PARTÍCULAS LENTIVIRALES**

### **5.1 Vectores lentivirales utilizados**

- 1) **siRNA-HIF-1 $\alpha$  (pLSLP-shRNA-HIF-1 $\alpha$ ):** contiene la secuencia del RNA de interferencia de HIF-1 $\alpha$ . Se obtuvo como se describió previamente [209].
- 2) **Control:** lleva la secuencia siRNA-HIF-1 $\alpha$  con las bases aleatoriamente ordenadas. Está incluido en un vector lentiviral pRNAT-U6.2 (GenScript, NJ, EEUU).
- 3) **pRRL.eGFP:** plásmido de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).
- 4) **pRSV-Rev:** lleva el cDNA del gen Rev bajo el promotor transcripcional del virus sincitial respiratorio (RSV).
- 5) **pMDLgag/pol-RRE:** contiene el elemento de respuesta a Rev (RRE). La interacción de Rev con RRE regula la exportación del mRNA al citoplasma y favorece la producción de proteínas virales. Este plásmido también lleva cDNA codificante de proteínas estructurales y de las enzimas retrotranscriptasa, integrasa y RNasa H (Gag-Pol).
- 6) **pMD2-VSVg:** vector que lleva la secuencia de la envuelta del virus.

## **5.2 Transfección de células HEK293T por precipitación con $\text{CaCl}_2$**

Las células empaquetadoras HEK293T al 30-40% de confluencia fueron incubadas con medio de cultivo fresco 3-4 horas antes de la transfección. Se preparó una solución de transfección que contenía  $\text{CaCl}_2$  2 M y los plásmidos de los vectores pMDLgag/pol-RRE 14,625  $\mu\text{g}$ , pRSV-Rev 5,625  $\mu\text{g}$ , pMD2-VSVg 7,875  $\mu\text{g}$  y el vector de transferencia correspondiente: pRRL.eGFP o los vectores lentivirales con la secuencia del siRNA-HIF-1 $\alpha$  o la secuencia control. Esta solución se añadió gota a gota sobre el tampón de transfección HBS 2X pH 7 (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). La mezcla preincubada 15 minutos a temperatura ambiente se añadió sobre cada cultivo (1/5 del volumen total del medio). A las 24 horas se cambió el medio de cultivo y a las 48 horas se determinó la eficacia de transfección mediante la observación microscópica del porcentaje de células GFP-positivas (GFP<sup>+</sup>). También, a las 48 horas se recogieron los sobrenadantes que contenían las partículas lentivirales y se conservaron a -80 °C.

## **5.3 Transducción de fibroblastos con lentivirus**

Los sobrenadantes recogidos 48 horas después de la transfección, se centrifugaron y se filtraron con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para transducir los fibroblastos se usó una dilución 1:10 de los sobrenadantes. La expresión de GFP de los fibroblastos en cultivo fue directamente examinada por microscopía de fluorescencia. La eficiencia del silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  se comprobó por Western blot y por qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) en tiempo real. Con este objetivo, los fibroblastos transducidos fueron incubados a 37 °C y expuestos a una atmósfera de 0,5%  $\text{O}_2$  22 horas o tratados con 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  durante 4 horas. Seguidamente se obtuvieron los pellets de los cultivos a los que se añadió Trizol (Invitrogen) para obtener RNA o un tampón de lisis para extraer proteínas.

## **6 WESTERN BLOT**

La proteína total de los fibroblastos en cultivo fue extraída con un tampón de lisis en hielo que contenía Tris HCl pH 8,1 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1%, y suplementado con los inhibidores de proteasas leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina-A 2 µg/ml y PMSF 0,5 mM (Sigma).

En un gel de acrilamida al 10% se separaron mediante electroforesis 30 µg de proteínas que posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (GE Healthcare, EEUU) mediante transferencia húmeda a 100 V durante 1 hora. Después de bloquear durante 2 horas con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T (tampón de Tris pH 7,6 20 mM, 137 mM NaCl y Tween-20), las membranas se incubaron a lo largo de la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico anti-HIF-1α (clon 54/Hif-1 BD PharMingen) diluido 1:400 en una solución de TBS-T con 0,5% de leche desnatada o el anticuerpo anti-β-actina (clon AC-15, Sigma) diluido 1:6000 en la misma solución. Las membranas se lavaron con TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz) diluido 1:3000. Las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (Pierce, IL, EEUU) y se analizaron por densitometría con el equipo ChemiDoc (BioRad, CA, EEUU).

## **7 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

A partir de los pellet celulares en Trizol se extrajo RNA total según las instrucciones del producto, y 1 µg se usó para obtener DNA complementario mediante el kit High capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem; CA, EEUU). La qPCR se llevó a cabo en un termociclador Roche Light Cycler utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos: para CXCL12, directo 5'-TCTGAGAGCTCGCTTGAGTG-3' y reverso 5'-GTGGATCGCATCT-ATGCATG-3'; para VEGF, directo 5'-GGTGAAGTTCATGGATGTCT-3' y reverso 5' GCT-GTAGGAAGCTCATCTCT-3'; y para β-actina, directo 5'-CTACCTCATGAAGATCCTCAC-3' y reverso 5'-GTCCACGTCA CACTTCATGATG-3'. Se realizó una cuantificación relativa en la que se comparó la cantidad de mRNA normalizado con la expresión del gen endógeno β-actina usando la



fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , donde  $C_t$  es la media de ciclos a la cual la amplificación del producto de la qPCR es inicialmente detectado.

## **8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el estudio estadístico se empleó el programa GraphPad Prism version 4.00. Para la comparación de medias entre dos variables con distribución normal, se usó el test de la t de Student y para las variables con distribución no normal se utilizó el test de rangos de Wilcoxon (datos pareados) o el test de Mann Whitney U (datos independientes). La comparación de medias entre más de dos grupos se analizó por ANOVA (test de Kruskal Wallis). La correlación entre variables se analizó mediante el test de Spearman (distribución no normal) o por el test de Pearson (distribución normal). Se aplicó la corrección de Bonferroni para los tests múltiples.



## **IV. RESULTADOS**

---

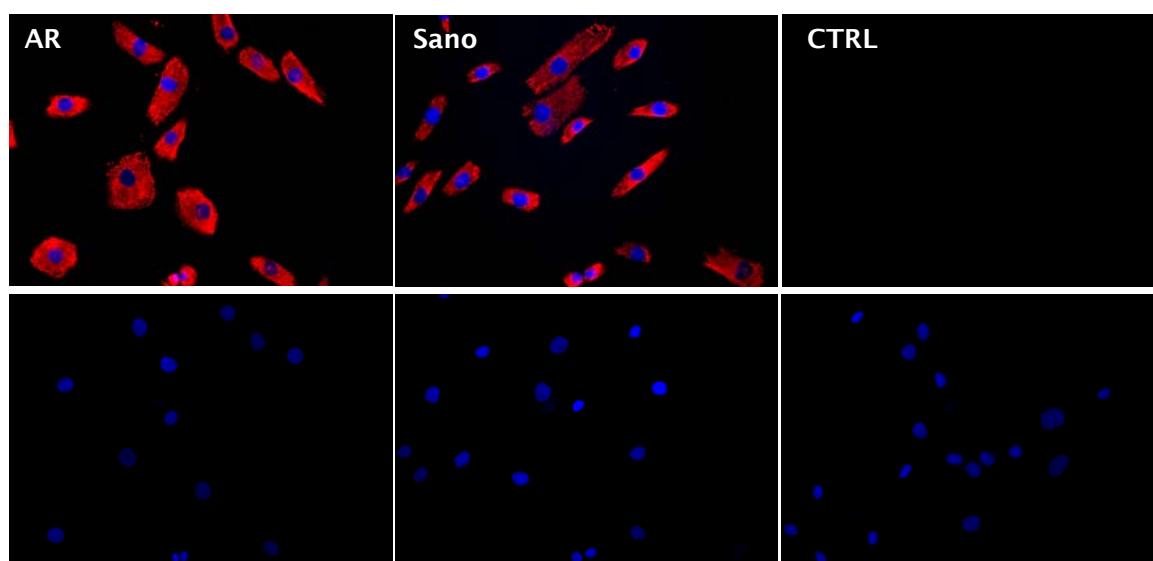


## 1 EXPANSIÓN DE LOS FIBROBLASTOS EN LA SINOVIAL REUMATOIDE

Se ha propuesto que la hiperplasia de los fibroblastos sinoviales contribuye a la patogénesis de la AR, pero no se dispone de información precisa sobre sus cambios cuantitativos en paralelo al desarrollo de la enfermedad. Esto es debido principalmente a la falta de marcadores cuantitativos adecuados.

### 1.1 Validación de hsp47 como marcador específico de fibroblastos sinoviales.

En otros tipos de fibroblastos se ha demostrado la expresión específica de la chaperona hsp47 de forma constitutiva e independiente de su estado de activación [71-72]. Con objeto de confirmar hsp47 como marcador de los fibroblastos sinoviales se realizó una tinción por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-hsp47 en fibroblastos en cultivo de pacientes con AR y de controles sanos. Se detectó que el 100% de los fibroblastos mostraban un marcaje uniforme, y localizado en un área citoplasmática morfológicamente compatible con el aparato de Golgi y vesicular (Figura IV.1)



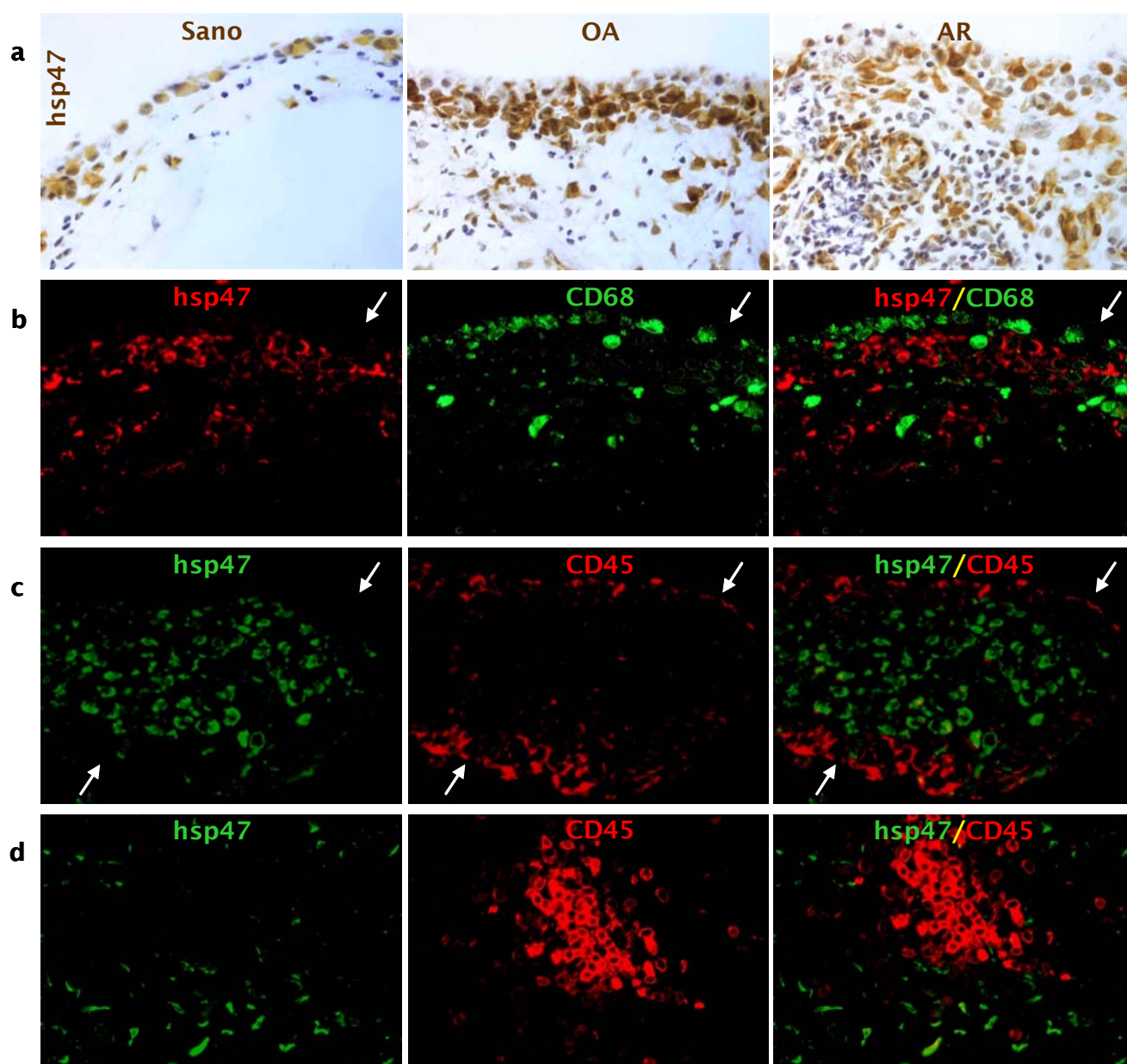
**Figura IV.1. Expresión de hsp47 en fibroblastos sinoviales en cultivo.** Fibroblastos de un paciente con AR y de un control sano marcados con el anticuerpo hsp47 (rojo). El panel de la derecha (CTRL) es un control de isotipo. Contratinción con DAPI (x400)

Para validar hsp47 como marcador específico de los fibroblastos se realizó una detección inmunohistoquímica en una serie de tejidos sinoviales de pacientes con AR, OA y de controles sanos. En todos los tejidos sinoviales el marcaje de hsp47 mostró un patrón celular específico que incluía numerosas células del *lining*, células con morfología fibroblástica del *sublining* y algunas células situadas alrededor de los vasos sanguíneos (Figura IV.2). Los infiltrados de células mononucleares fueron hsp47-negativos.

El doble marcaje para CD68 (macrófagos) y hsp47 no detectó colocalización (Figura IV.2b), confirmando estudios previos [71]. El doble marcaje con el marcador pan-leucocitario CD45 y hsp47 mostró que ambos marcadores son mutuamente excluyentes (Figura IV.2c y d).

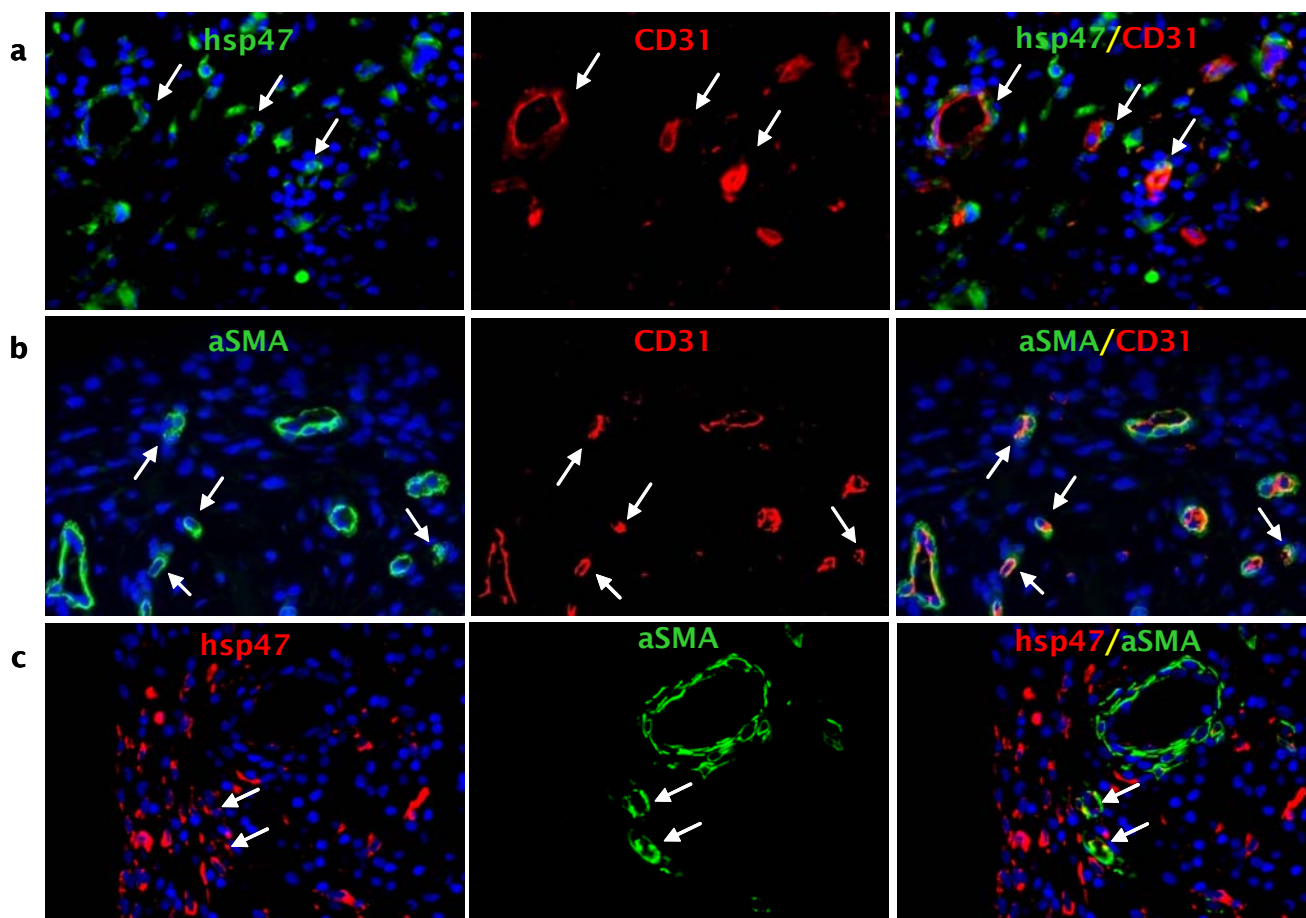
Para una mejor identificación de las células perivasculares hsp47-positivas (hsp47<sup>+</sup>), se realizó un doble marcaje con el anticuerpo para CE con anti-CD31 (Figura IV.3a). No se detectó colocalización entre los dos marcadores, confirmando que estas células son pericitos o fibroblastos perivasculares y no CE. Además, estas células perivasculares coexpresan hsp47 y el marcador de pericitos y miofibroblastos aSMA (Figura IV.3c). En los vasos de mayor calibre de las zonas más profundas los fibroblastos perivasculares, pero no las células musculares lisas (también aSMA<sup>+</sup>), fueron hsp47<sup>+</sup>.

Por lo tanto hsp47 es un marcador específico de fibroblastos sinoviales que incluye: fibroblastos del *lining*, fibroblastos intersticiales del *sublining* y fibroblastos perivasculares o pericitos, siendo negativo en leucocitos endotelio y músculo liso.



**Figura IV.2. Validación de hsp47 como marcador específico de fibroblastos sinoviales.**

(a) Detección inmunohistoquímica de hsp47 por inmunoperoxidasa en el tejido sinovial de un control sano y de pacientes con OA o AR (contratinción con hematoxilina). (b) Doble marcaje de hsp47 (rojo) y CD68 (verde) en tejido sinovial de un paciente con AR. (c, d) Doble marcaje de hsp47 (verde) y CD45 (rojo) en tejido sinovial de pacientes con AR. Las flechas señalan la superficie del *lining*. (x400)



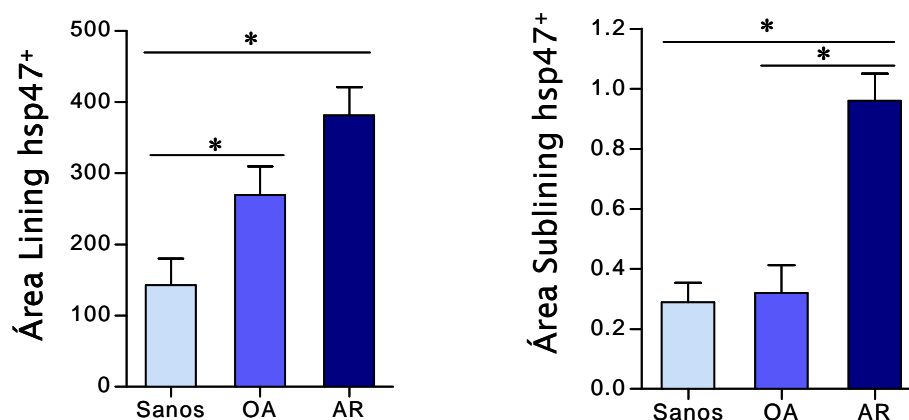
**Figura IV.3. Identificación de células hsp47-positivas perivasculares en tejido sinovial.** (a) Doble marcaje por inmunofluorescencia de hsp47 (verde) y CD31 (rojo). Las flechas señalan algunas células hsp47<sup>+</sup> perivasculares. (b) Doble marcaje por inmunofluorescencia de aSMA (verde) y CD31 (rojo). Las flechas muestran que todas las células aSMA<sup>+</sup> son perivasculares (pericitos). (c) Doble marcaje de hsp47 (rojo) y aSMA (verde). Las flechas señalan las células Hsp47<sup>+</sup> y aSMA<sup>+</sup>. Contratinción con DAPI(x400).



## 1.2 Cuantificación del área fibroblástica en tejidos sinoviales

La distribución de los fibroblastos hsp47<sup>+</sup> en los diferentes tejidos sinoviales fue variable. En los tejidos de individuos sanos, se observó una sola capa de células que contenía fibroblastos alternando con células hsp47<sup>-</sup>. En los tejidos de pacientes con OA o AR, se observó un aumento en la proporción de fibroblastos hsp47<sup>+</sup>, ordenados en varias capas en la zona basal del *lining*, mientras que las células más superficiales eran frecuentemente hsp47<sup>-</sup> (Figura IV.2a), de forma concordante con descripciones previas respecto a la posición relativa en el *lining* de las células de estirpe macrofágica [210].

Mediante análisis de imagen se determinó el área ocupada por los fibroblastos (hsp47<sup>+</sup>) en tejido sinovial de pacientes con AR, OA y controles sanos. El área fibroblástica del *lining* fue significativamente mayor en los tejidos sinoviales de pacientes con OA o AR que en los controles sanos, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos de OA y AR (Figura IV.4). En los tejidos reumatoides se detectó un aumento significativo del área fibroblástica del *sublining* comparada con los tejidos OA y sano, pero no se detectaron diferencias significativas entre los tejidos OA y normales. (Figura IV.4).



**Figura IV. 4. Detección y cuantificación del área hsp47-positiva en tejidos sinoviales.** Las gráficas representan la media  $\pm$  ES (error estándar) del área fibroblástica hsp47<sup>+</sup> en los diferentes grupos. Los datos son representativos de 48 pacientes con AR, 14 con OA y 6 individuos sanos. \*P<0,05 OA o AR *versus* sanos en *lining*, y AR *versus* OA y sanos en *sublining*.

### 1.3 Correlaciones clínico-patológicas de la hiperplasia sinovial

Para analizar el significado clínico de la expansión fibroblástica en la sinovial reumatoide, estudiamos su posible correlación con variables clínico-patológicas relevantes en una amplia serie de pacientes con AR (Tabla III.1).

El aumento del área ocupada por fibroblastos en el *lining* y *sublining* fue variable entre diferentes individuos con AR que eran también heterogéneos en relación a la duración de la enfermedad y a la actividad o severidad de la AR. Por lo tanto, se analizó si la actividad inflamatoria clínica (DAS28 y PCR), el infiltrado celular inflamatorio (CD68, CD3, CD20), la densidad vascular (CD31) o la duración de la enfermedad correlacionaban con el aumento observado del área de fibroblastos del *lining* o *sublining* (Tabla IV.1).

El área fibroblástica del *lining* correlacionó significativa y positivamente con la densidad del infiltrado de macrófagos CD68<sup>+</sup> en el *sublining*, un marcador validado de actividad inflamatoria en la AR (Figura IV.5a) [211]. No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas con el infiltrado de células T o B.

La actividad clínica DAS28 y la duración de la enfermedad en el momento de la biopsia correlacionaron significativamente con el área de fibroblastos del *lining* (Tabla IV.5). Se observó un aumento progresivo del área fibroblástica del *lining* en paralelo a la duración de la enfermedad, detectable desde las fases más tempranas (Figura IV.5a). Para confirmar esta correlación se comparó el área fibroblástica del *lining* entre los grupos con enfermedad precoz (<1 año) y tardía (>1 año), confirmándose un aumento significativo ( $P < 0,008$ ) en el grupo de enfermedad tardía (Figura IV.5a).

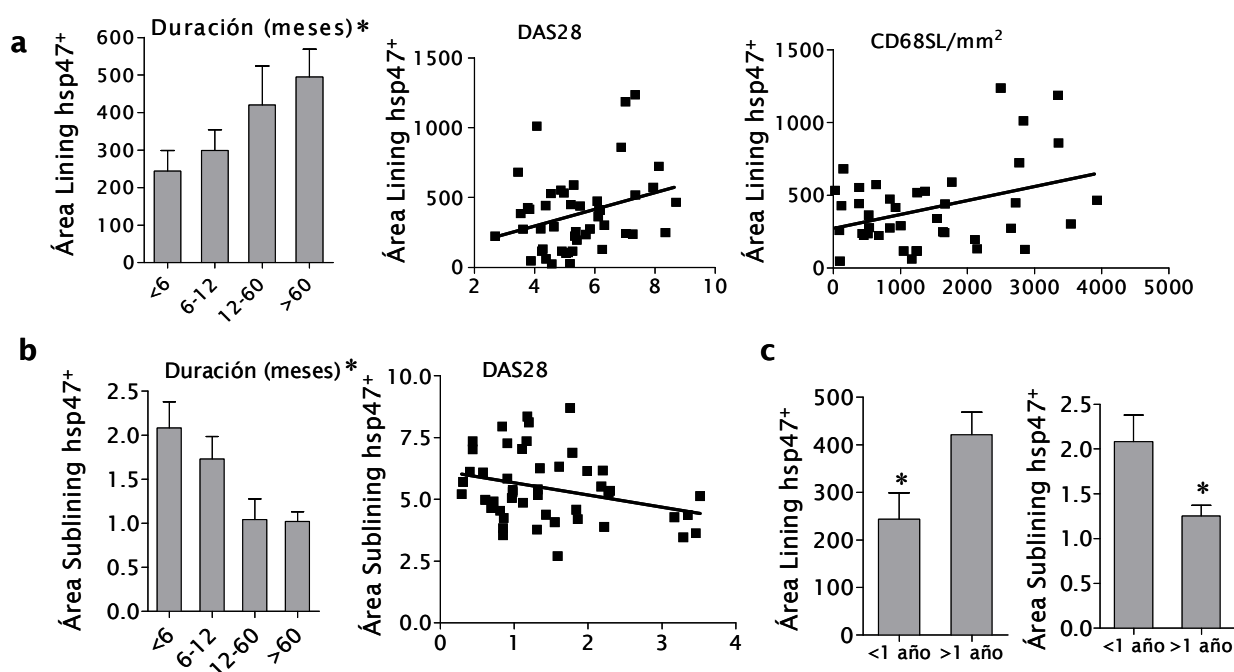
El área hsp47-positiva del *sublining* disminuyó significativamente a medida que aumentaba la duración de la enfermedad. El área fibroblástica del *sublining* fue mayor en el grupo de enfermedad precoz que en el de enfermedad tardía (Figura IV.5b). Además, el área fibroblástica del *sublining* correlacionó negativamente con la actividad inflamatoria de la enfermedad (DAS28) (Tabla IV.1, Figura IV.5). No se hallaron otras correlaciones clínico-patológicas significativas con el área fibroblástica del *sublining*.

No se encontraron diferencias significativas en el área fibroblástica del *lining* ni del *sublining* en pacientes estratificados por enfermedad erosiva en el momento de la biopsia, o por la presencia de autoanticuerpos FR o ACPA (datos no mostrados).

**Tabla IV.1. Correlaciones clínico-patológicas del área fibroblástica en tejidos de pacientes con AR\***

	Área <i>Lining</i> hsp47 <sup>+</sup>		Área <i>Sublining</i> hsp47 <sup>+</sup>	
	P-valor	r	P-valor	r
CD3/mm2	0,751	0,05	0,695	0,06
CD20/mm2	0,890	-0,02	0,675	-0,06
CD68SL/mm2	<b>0,017</b>	0,38	0,922	0,02
CD31 vasos/mm2	0,078	0,25	0,662	0,06
PCR	0,088	0,30	0,089	-0,25
DAS28	<b>0,039</b>	0,24	<b>0,041</b>	-0,30
Duración enfermedad (meses)	<b>0,013</b>	0,36	<b>0,003</b>	-0,43

\* Test de Spearman o de Pearson.



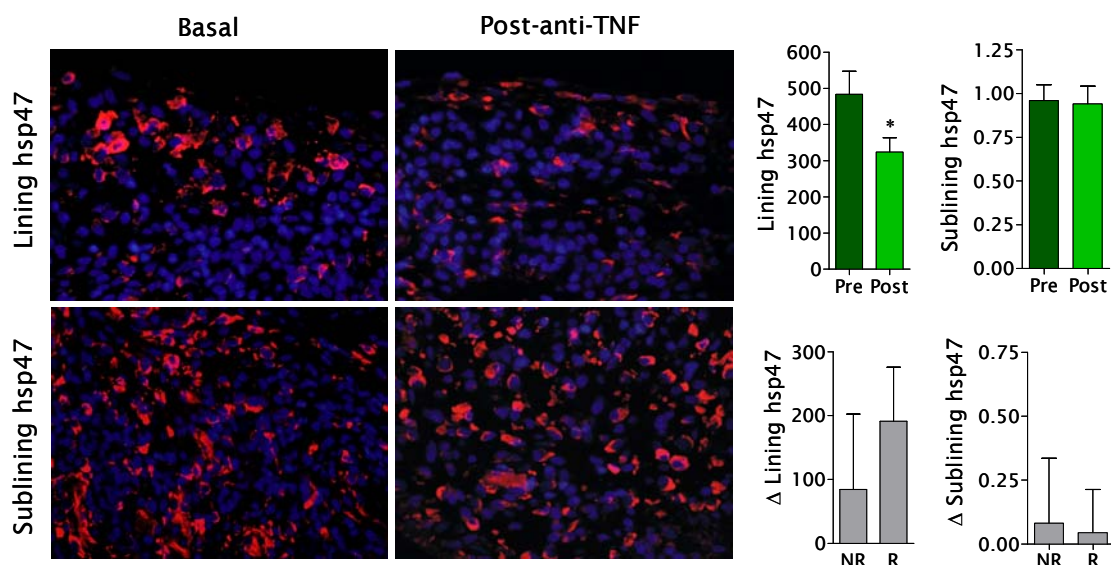
**Figura IV.5 Correlación entre el área media fibroblástica del *lining* o *sublining* y variables clínico-patológicas.** Representación gráfica de las correlaciones entre el área fibroblástica hsp47<sup>+</sup> del *lining* (a) y del *sublining* (b) con la duración de la enfermedad, el valor DAS28 y la densidad de macrófagos (CD68/mm<sup>2</sup>). Los datos estadísticos están resumidos en la Tabla IV.1. La media de las áreas hsp47 se estratificó por la duración de la enfermedad en meses. (c) El área de fibroblastos del *lining* en enfermedad precoz (<1 año) *versus* tardía (\*P<0,008). El área de fibroblastos del *sublining* en enfermedad precoz *versus* tardía (\*P<0,0001). Datos representativos de 48 pacientes con AR.

#### 1.4 Efectos de la terapia anti-TNF- $\alpha$ sobre la hiperplasia de los fibroblastos sinoviales

Los cambios cuantitativos en la expansión de los fibroblastos después del tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  se analizaron en biopsias secuenciales en un subgrupo de 25 pacientes. En el momento de realizarse la segunda biopsia tras el tratamiento ( $10 \pm 2$  meses), 7 pacientes no habían respondido a la terapia anti-TNF- $\alpha$ , y el resto tenían una respuesta EULAR moderada ( $n=6$ ) o buena ( $n=12$ ) [212]. En el grupo total ( $n=25$ ) se observó una mejora significativa del valor de actividad DAS28, una disminución significativa de la infiltración sinovial por células T y macrófagos, y una reducción no significativa del infiltrado de células B después de la terapia. Éstos y otros datos clinicopatológicos han sido descritos anteriormente en la Tabla III.2.

El tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  indujo una disminución significativa del área fibroblástica del *lining* pero no del *sublining* considerando todos los pacientes ( $n=25$ ) (Figura IV.6). En los pacientes respondedores se observó una tendencia hacia una mayor disminución del área de fibroblastos del *lining* en comparación con los no-respondedores pero ésta no alcanzó significación estadística (Figura IV.6). No se observaron cambios en los fibroblastos del *sublining* ni en los pacientes respondedores ni en los no-respondedores (Figura IV.6).

Los análisis de correlaciones entre la disminución de los fibroblastos del *lining* y otros cambios clinicopatológicos mostraron una correlación positiva no estadísticamente significativa con la densidad de células T CD3<sup>+</sup>, B CD20<sup>+</sup>, de macrófagos CD68<sup>+</sup> del *sublining*, con la PCR y el DAS28, pero no con la vascularidad (Tabla IV.2).



**Figura IV.6 Cambios en las áreas fibroblásticas del *lining* y *sublining* después de la terapia con anti-TNF- $\alpha$ .** Marcaje por inmunofluorescencia de hsp47 (rojo) en tejido sinovial de un paciente con AR tratado con anti-TNF- $\alpha$  (x400, contratinción con DAPI). Las gráficas representan datos de 25 pacientes. Pre: biopsia basal; Post: biopsia post-terapia anti-TNF- $\alpha$ . R/NR: grupos de pacientes que alcanzaron (R) o no (NR) una respuesta EULAR buena o moderada en la segunda biopsia. \*P<0,03 (test de Student para datos pareados).

**Tabla IV.2. Correlaciones entre los cambios del área fibroblástica del *lining* y los cambios clinicopatológicos después de la terapia con anti-TNF- $\alpha$ .**

	$\Delta$ Área fibroblástica <i>Lining</i> *	
	P-valor	r
$\Delta$ CD3/mm <sup>2</sup>	0,082	0,35
$\Delta$ CD20/mm <sup>2</sup>	0,601	0,08
$\Delta$ CD68SL/mm <sup>2</sup>	0,071	0,36
$\Delta$ CD31 vasos/mm <sup>2</sup>	0,452	-0,15
$\Delta$ PCR	0,067	0,37
$\Delta$ DAS28 3v1	0,177	0,27

\*  $\Delta$  Indica la diferencia entre el valor basal menos el valor después del tratamiento. Test de Spearman o Pearson.

## 2 CAMBIOS VASCULARES EN LA SINOVIAL REUMATOIDE

Un factor importante en la patogénesis de la AR es la formación de nuevos vasos. En otras enfermedades donde se produce un activa angiogénesis se han detectado vasos inmaduros que carecen de células periendoteliales. Con el objetivo de estudiar la presencia de vasos inmaduros en tejidos sinoviales de pacientes con AR, analizamos la dinámica vascular sinovial durante la enfermedad y en respuesta al tratamiento con antagonistas del TNF- $\alpha$ .

### 2.1 Densidad y estructura vascular en tejidos sinoviales reumatoides

Para estudiar la organización y densidad vascular en los tejidos sinoviales reumatoides se analizó cuantitativamente la estructura vascular pericito/endotelio en una serie de biopsias de pacientes con AR, OA y controles sanos.

Se realizó un doble marcaje de las células del endotelio (CD31<sup>+</sup>) y de los pericitos (aSMA<sup>+</sup>), y se identificaron y cuantificaron los vasos maduros: CD31<sup>+</sup> y cubiertos de pericitos (aSMA<sup>+</sup>), y también los vasos CD31<sup>+</sup> sin cubierta de pericitos (aSMA<sup>-</sup>), considerados vasos inmaduros (Figura IV.9a). La mayoría de los tejidos reumatoides (66/82) tenían vasos inmaduros en número variable, mientras que en los tejidos artrósicos sólo se detectaron en una baja proporción (3/14). En los tejidos sanos no se observó ningún vaso inmaduro (0/4) (Tabla IV.3). Los vasos inmaduros del tejido reumatoide eran predominantemente de tamaño pequeño, y estaban situados principalmente en la zona del *sublining*, en áreas de abundante infiltración inflamatoria (Figura IV.9a). Al estudiar la presencia de vasos inmaduros en distintas áreas (biopsias) de la misma articulación de los pacientes se halló una concordancia completa en un 30% de los casos, y parcial (al menos en dos pero no en todas las biopsias) en un 53%, mientras que en un 17% sólo una de las áreas evaluadas contenía vasos inmaduros.

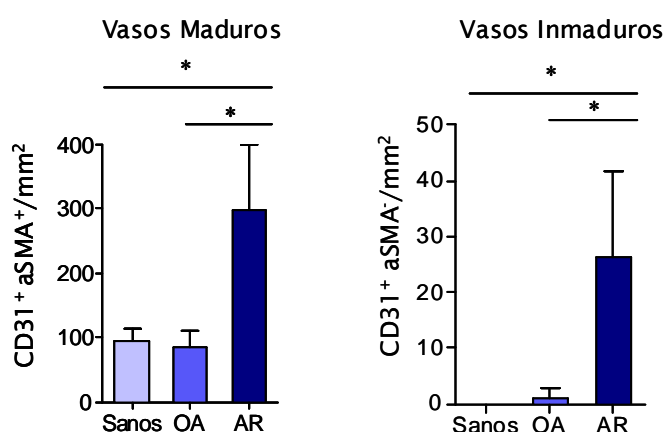
Tanto el área CD31<sup>+</sup> como el número total de vasos maduros por área estaban aumentados significativamente en los tejidos reumatoides comparados con los artrósicos y los normales (Tabla IV.3, Figura IV.8). A pesar de que ambas determinaciones no son equivalentes, ya que el área marcada depende del número y también del tamaño de los vasos, se confirmó una correlación positiva estadísticamente significativa entre los datos adquiridos manualmente sobre el número de vasos CD31<sup>+</sup> o aSMA<sup>+</sup> por área y el área CD31<sup>+</sup> o aSMA<sup>+</sup> analizada digitalmente.

Ocasionalmente, en los vasos linfáticos de diferentes tejidos se ha detectado un débil marcaje CD31 [213]. Aunque por microscopia de contraste de fase se observaron eritrocitos en el lumen de algunos vasos inmaduros (datos no mostrados), para excluir formalmente que el posible marcaje con CD31 de algunos vasos linfáticos pudiera explicar la presencia de los vasos CD31<sup>+</sup> sin cubierta periendotelial (aSMA<sup>-</sup>), se realizó un doble marcaje con CD31 y podoplanina, un marcador específico de vasos linfáticos. La podoplanina fue detectada por inmunoperoxidasa debido a la menor sensibilidad del marcaje por fluorescencia. Se confirmó que ambos marcajes eran excluyentes, y por lo tanto que los vasos CD31<sup>+</sup> y aSMA<sup>-</sup> del tejido sinovial AR eran vasos sanguíneos inmaduros y no linfáticos (Figura IV.9b).

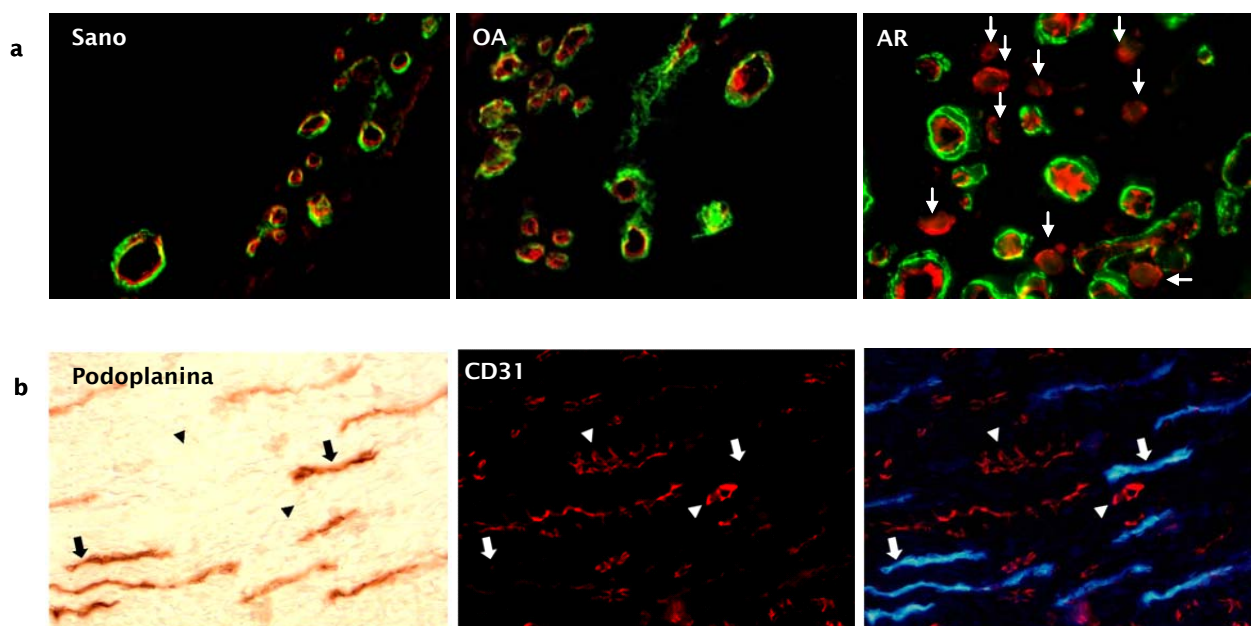
**Tabla IV.3. Vasos maduros e inmaduros en los tejidos sinoviales de pacientes con AR, OA y controles normales.**

	AR (n=82)	OA (n=14)	Normal (n=4)	P-valor*
Vasos CD31 <sup>+</sup> aSMA <sup>+</sup> /mm <sup>2</sup>	294±95	74±28	94±44	<0,0001
Vasos CD31 <sup>+</sup> aSMA <sup>-</sup> /mm <sup>2</sup>	26±27	0,6±1.2	0±0	<0,0001
Vasos totales/mm <sup>2</sup>	319±98	74,5±28	94±44	<0,0001
Tejidos con vasos CD31 <sup>+</sup> aSMA <sup>-</sup>	66/82 (80%)	3/14 (21%)	0/4 (0%)	<0,0001

CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>+</sup>: Vasos maduros; CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>-</sup>: Vasos inmaduros; Vasos totales representa la suma de los vasos maduros e inmaduros. \* AR *versus* OA.



**Figura IV.8. Cuantificación de la vasculatura sinovial de pacientes con AR, OA y controles sanos.** Representación gráfica de los datos de la Tabla IV.3. CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>+</sup>: Vasos maduros; CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>-</sup>: Vasos inmaduros. \* P<0,0001 AR *versus* OA y sanos.



**Figura IV.9. Detección de los vasos sanguíneos maduros e inmaduros en tejido sinovial.** (a) Doble marcaje inmunofluorescente del endotelio (CD31, rojo) y los pericitos/células de músculo liso (aSMA, verde) en un tejido sinovial normal, de un paciente con OA y de un paciente con AR. Las flechas señalan vasos inmaduros ( $CD31^{+}/aSMA^{-}$ ). (b) Doble marcaje de los vasos linfáticos detectados por inmunoperoxidasa (podoplanina<sup>+</sup>) y vasos  $CD31^{+}$  marcados por inmunofluorescencia en tejido sinovial reumatoide. Se invirtió la imagen con luz del microscopio y se superpuso con la imagen de fluorescencia de CD31 para mostrar la posición de los vasos podoplanina<sup>+</sup> (azul, flecha) y los  $CD31^{+}$  (rojo, cabeza de flecha). (x400).

## 2.2 Correlaciones clínico-patológicas de la presencia y densidad de vasos inmaduros en tejidos sinoviales reumatoides

Como se ha señalado anteriormente, los 82 pacientes analizados representaban una muestra transversal no seleccionada, y heterogénea en términos de duración de enfermedad y características demográficas, clínicas y analíticas.

Se analizó si determinadas características de la enfermedad, como la duración o diversos marcadores de actividad y severidad, correlacionaban con la presencia o abundancia de vasos inmaduros en el tejido sinovial (Tabla IV.4). La presencia de vasos inmaduros se asoció significativamente con una mayor duración de la enfermedad ( $101 \pm 104$  versus  $7,8 \pm 3,6$  meses;  $P < 0,0001$ ; Tabla IV.4; Figura IV.10a). La densidad de vasos inmaduros también correlacionó positiva y significativamente con la duración de la enfermedad



(Figura IV.10b). Por el contrario, la densidad de vasos maduros no correlacionó con la duración de la enfermedad. En las Figuras IV.10c y IV.10d se muestran los datos de densidad de los vasos inmaduros y maduros estratificados por fracciones de duración de la enfermedad.

La actividad media de la enfermedad evaluada por el índice DAS28 fue ligeramente mayor en pacientes con vasos inmaduros en la sinovial (Tabla IV.4 y Figura IV.10e), pero las diferencias no eran estadísticamente significativas. Como se muestra en la Figura IV.10f, la densidad de los vasos inmaduros fue significativamente menor en los grupos con baja actividad de la enfermedad frente a los de moderada y alta actividad. Además, la densidad de los vasos inmaduros correlacionó positiva y significativamente con el valor DAS28 (Figura IV.10h). Por el contrario, la densidad de vasos maduros no correlacionó con la actividad de la enfermedad.

La presencia de enfermedad erosiva en el momento de obtención de las biopsias fue mayor en el grupo de pacientes con vasos inmaduros (78% *versus* 40%; Tabla IV.4, Figura IV.10i). Estratificando los distintos grupos por sexo, edad o presencia/ausencia de autoanticuerpos FR o ACPA, no se encontraron diferencias significativas con la presencia ni con la densidad de vasos inmaduros o maduros (Tabla IV.4).

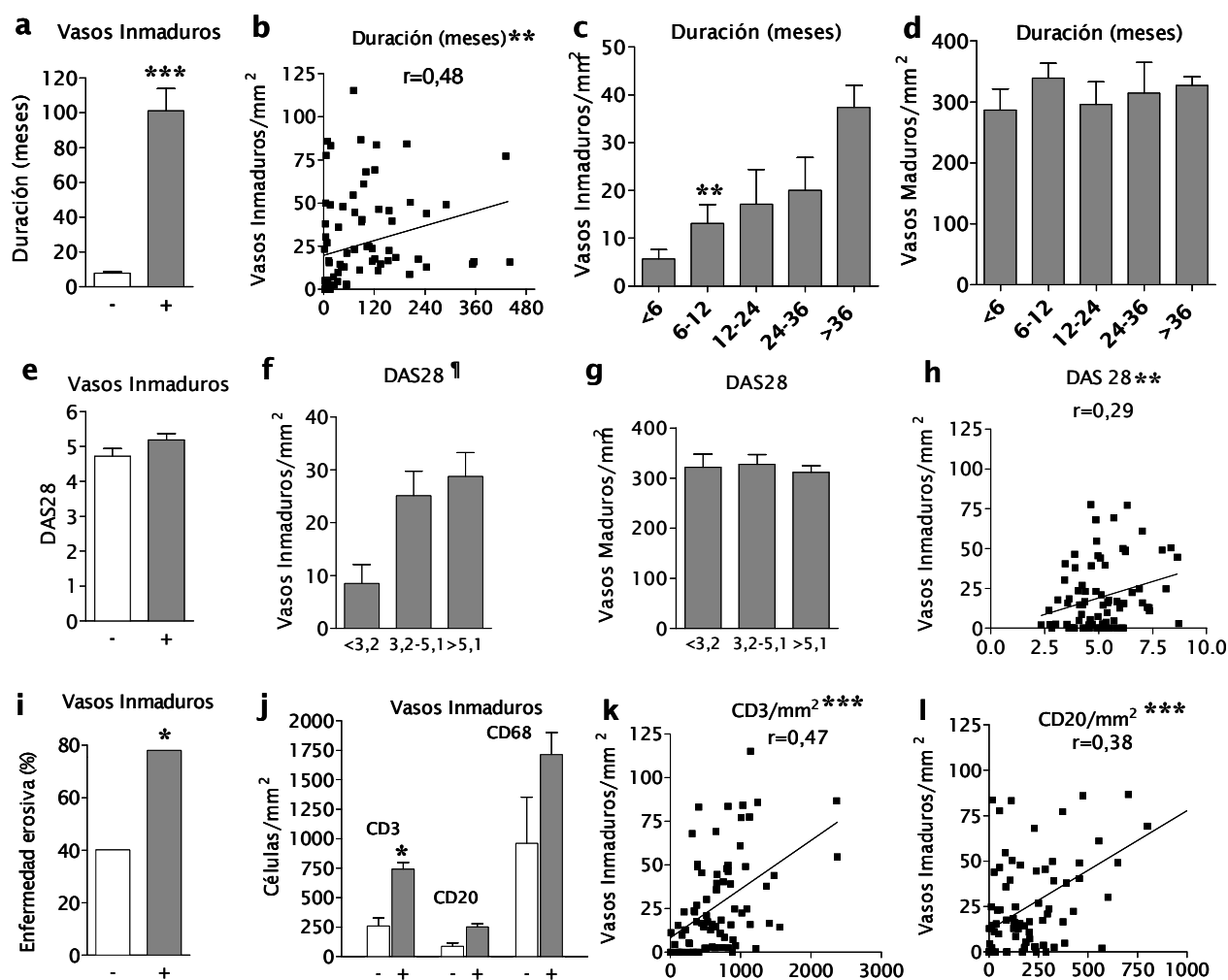
Se cuantificó la inflamación de la sinovial como densidad de infiltrado celular de macrófagos, células T, células B, y su organización en agregados linfoides caracterizada como neogénesis linfoide (LN) como se ha descrito anteriormente [214]. Se analizó la correlación entre estos parámetros con la presencia y densidad de vasos inmaduros. Los tejidos con vasos inmaduros tenían una mayor densidad de células T CD3<sup>+</sup>, células B CD20<sup>+</sup> y macrófagos CD68<sup>+</sup> (Tabla IV.4; Figura IV.10j). Se encontró una correlación positiva entre la densidad de vasos inmaduros con la densidad de células T (Figura IV.10k) pero no con la densidad de macrófagos del *sublining*. Los tejidos con vasos inmaduros presentaban una mayor densidad de células B y de LN pero después de la corrección para comparaciones múltiples la diferencia fue no significativa. No se encontró correlación entre la densidad de vasos maduros con la infiltración celular de ningún tipo ni la presencia de LN.

Tabla IV.4. Datos clinicopatológicos estratificados por la presencia de vasos inmaduros.

PACIENTES	Totales n=82	Sin Vasos Inmaduros n=16	Con Vasos Inmaduros n=66	P-valor*
Edad (años)	58±13	53±10	59±10	NS
Mujeres (%)	68%	69%	68%	NS
Duración AR (meses)	83±100	7,8±3,6	101±104	<0,0001
DAS28	5.1±1.4	4,7±0,8	5,2±1,5	NS
PCR (mg/dl)	4,02±3,43	3,08±2,92	4.25±3.50	NS
Erosión (%)	67%	40%	78%	0,0039
Autoanticuerpos-positivos †	71%	65%	72%	NS
CD3 <sup>+</sup> T (células/mm <sup>2</sup> )	667±466	258±239	742±460	0,0002
CD20 <sup>+</sup> B (células/mm <sup>2</sup> )	226±205	87±98	251±211	NS
CD68 <sup>+</sup> (células/mm <sup>2</sup> )	1643±1326	990±1037	1729±1336	NS
LN (%)	48%	29%	52,4%	NS
Vasos maduros/mm <sup>2</sup>	294±95	279±111	298±92	NS

Datos tomados en el momento de la biopsia. Vasos inmaduros: CD31<sup>+</sup>/aSMA<sup>-</sup>, DAS28: valor de actividad de la enfermedad, PCR: Proteína C reactiva, LN: Neogénesis Linfoide; NS: No significativo. \* Datos pacientes sin vasos inmaduros *versus* pacientes con vasos inmaduros.

† Autoanticuerpos FR o ACPA.



**Figura IV.10. Correlaciones clínico-patológicas de los vasos sanguíneos inmaduros en tejidos sinoviales de pacientes con AR.** Representación gráfica de los datos de (a) duración de la enfermedad, (e) valor DAS28, (i) enfermedad erosiva e (j) infiltración celular por CD3, CD20 o CD68 en el tejido sinovial agrupado a los pacientes por la presencia (+) o ausencia (-) de vasos inmaduros (CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>-</sup>). Densidad de los vasos inmaduros (vasos CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>-</sup>/mm<sup>2</sup>) o maduros (vasos CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) en pacientes estratificados por (c, d) duración de la enfermedad o (f, g) niveles de actividad (baja: DAS28<3,2, moderada 3,2-5,1 o alta >5,1). Se muestran los coeficientes de la correlación por el test de Spearman entre la densidad de vasos inmaduros y (b) la duración de la enfermedad, (h) el valor DAS28 o (k) el infiltrado CD3 o (l) CD20. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.† Test de Kruskal Wallis y post-test de Dunns, P=0,04 (grupos de actividad baja *versus* moderada o alta).

### 2.3 Efectos de la terapia anti-TNF- $\alpha$ sobre los vasos sanguíneos maduros e inmaduros

Los cambios inducidos por la terapia se analizaron en el subgrupo de 25 pacientes rebiopsiados después del tratamiento con anti-TNF- $\alpha$ . Se evaluaron las posibles variaciones en la estructura y abundancia de los vasos inmaduros tras el tratamiento, y si estos cambios correlacionaban con los cambios clínicos de la enfermedad en respuesta a esta terapia.

Se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de vasos inmaduros CD31<sup>+</sup>/aSMA<sup>-</sup> por mm<sup>2</sup> en las biopsias obtenidas después de la terapia (Tabla IV.5). Sin embargo, el número de vasos maduros CD31<sup>+</sup>/aSMA<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup> no estaba modificado significativamente (Tabla IV.5). El área CD31 disminuyó significativamente después de la terapia mientras que el área aSMA no se modificó (Tabla IV.5). La disminución relativa en la densidad de vasos inmaduros fue mayor en pacientes que obtuvieron una mejor respuesta EULAR (P=0,01). En la Tabla IV.5 se muestran los cambios clínicos y patológicos de los pacientes respondedores y no-respondedores.

**Tabla IV.5 Cambios clinicopatológicos después de la terapia anti-TNF- $\alpha$ .**

	Basal	Post-terapia	P-valor	$\Delta$ Cambio No-respondedores*	$\Delta$ Cambio Respondedores*
Vasos CD31 <sup>+</sup> aSMA <sup>-</sup> /mm <sup>2</sup>	52 $\pm$ 31	31 $\pm$ 27	0,017	-0,4 $\pm$ 13	12 $\pm$ 16
Área CD31 <sup>+</sup> (%)	3,1 $\pm$ 1,6	2,5 $\pm$ 1,4	0,03	-0,2 $\pm$ 2,1	0,9 $\pm$ 1,0
Vasos CD31 <sup>+</sup> aSMA <sup>+</sup> /mm <sup>2</sup>	276 $\pm$ 82	321 $\pm$ 110	NS	-30 $\pm$ 25	-8 $\pm$ 59
Área aSMA <sup>+</sup> (%)	3,68 $\pm$ 1,6	3,60 $\pm$ 1,4	NS	-0,1 $\pm$ 1,9	0,1 $\pm$ 1,7

CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>-</sup>; Vasos inmaduros; CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>+</sup>; Vasos maduros. Test de Wilcoxon: P-valor de los valores basales *versus* los obtenidos después del tratamiento con anti-TNF- $\alpha$ . \*  $\Delta$  Disminución absoluta de los niveles basales en pacientes con buena o moderada respuesta EULAR (respondedores) a la terapia con anti-TNF- $\alpha$  y de los no-respondedores.

### 3 FENOTIPO PRO-ANGIOGÉNICO DE LOS FIBROBLASTOS REUMATOIDES

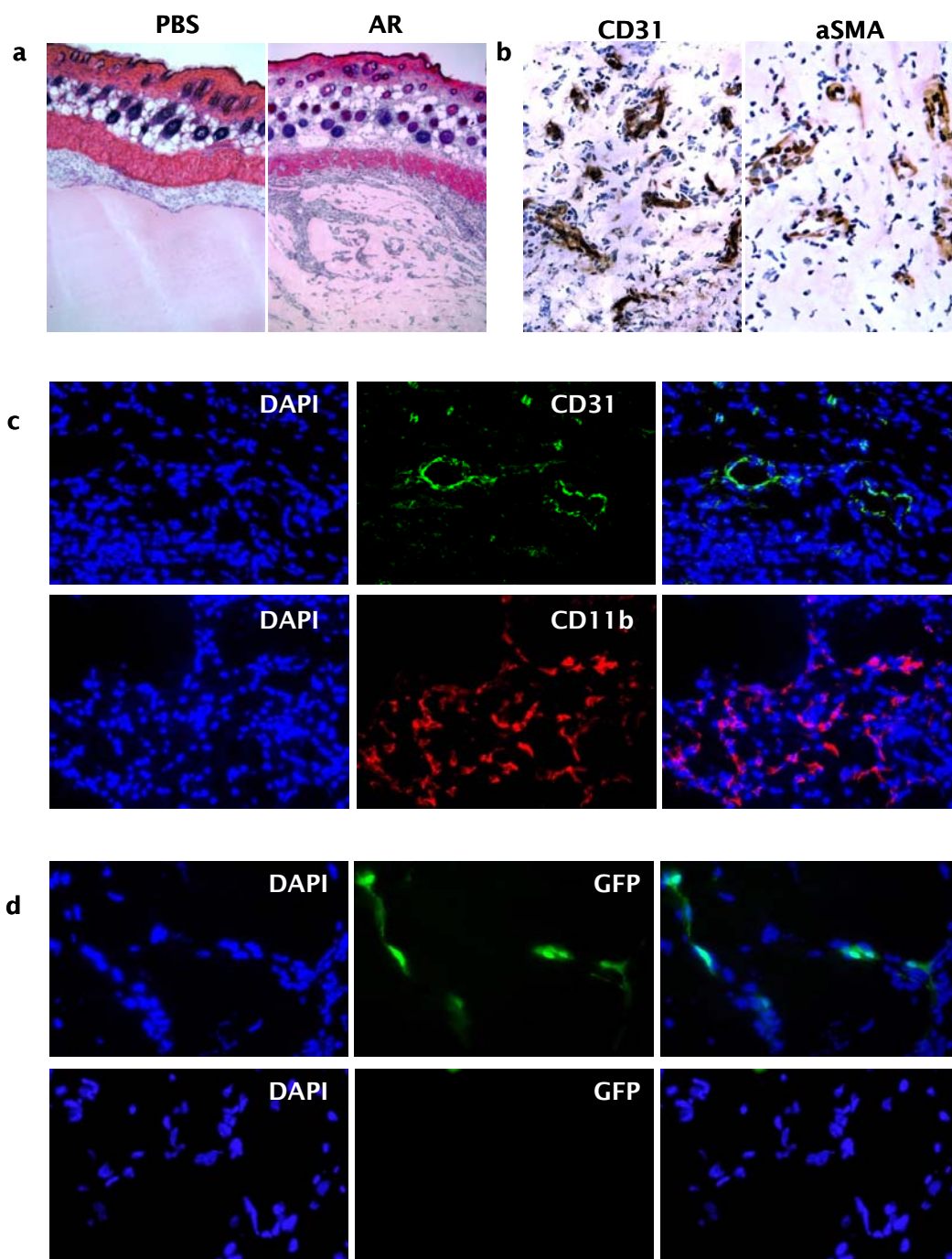
Los fibroblastos reumatoides son una fuente importante de factores proangiogénicos pero su capacidad intrínseca de inducir angiogénesis en ausencia de otros estímulos o tipos celulares se desconoce. Para analizar ésta capacidad se utilizó un modelo de transferencia ex vivo de estas células a ratones inmunodeficientes.

#### 3.1 Inducción de angiogénesis y reclutamiento de células mieloides por fibroblastos inflamatorios en ratones inmunodeficientes.

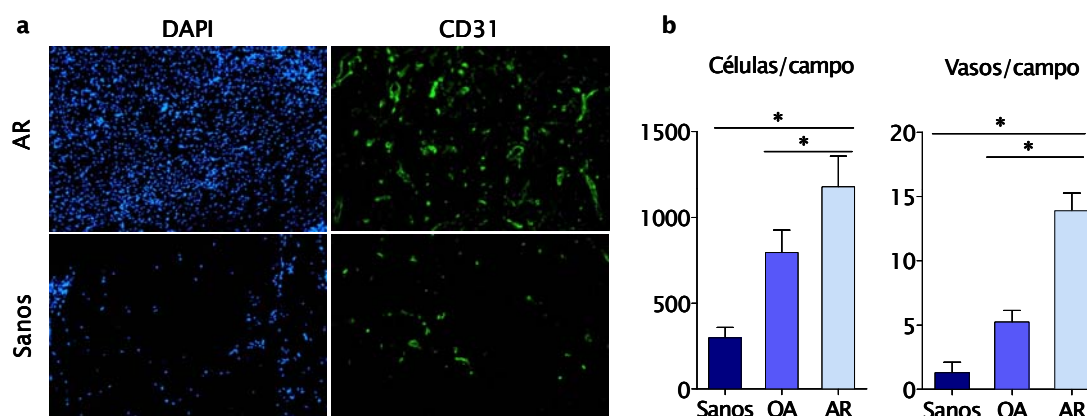
Para examinar la capacidad intrínseca que poseen los fibroblastos sinoviales inflamatorios de inducir angiogénesis y/o reclutamiento celular, se realizaron implantes de matrigel con fibroblastos sinoviales derivados de tejidos inflamatorios (OA y AR) en ratones inmunodeficientes mediante inyección subcutánea. Después de 7 días los implantes mostraban un denso infiltrado celular y estructuras con morfología vascular con lumen. Sin embargo, los implantes de matrigel sin fibroblastos, permanecieron completamente acelulares y sin estructuras vasculares (Figura IV.11a). Las estructuras vasculares en los implantes de fibroblastos inflamatorios se identificaron como vasos compuestos por células endoteliales CD31<sup>+</sup> y células perivasculares  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> o pericitos, rodeados de un importante infiltrado celular mayoritariamente positivo para el marcador de células mieloides CD11b (Figura IV.11b y c).

Los fibroblastos implantados se pudieron detectar tras la extracción del implante, transduciendo previamente dichas células con un lentivirus de expresión de GFP. En los cultivos de fibroblastos transducidos se detectó un 90% de células GFP-positivas (GFP<sup>+</sup>). Los fibroblastos GFP<sup>+</sup> representaban una pequeña proporción del total de células en el implante a los 7 días. Por otra parte, los fibroblastos GFP<sup>+</sup> mostraron una distribución dispersa y diferente de las estructuras vasculares, descartando así la diferenciación de los mismos en endotelio CD31<sup>+</sup> (Figura IV.11d).

La intensidad del infiltrado celular y la densidad vascular fueron variables entre implantes de diferentes líneas de fibroblastos pero más reproducible entre distintos implantes con la misma línea. La respuesta máxima fue inducida por los grupos de fibroblastos de AR, aunque los fibroblastos de OA también indujeron una respuesta importante. Ambas fueron significativamente mayores que las observadas en implantes de fibroblastos de tejido sinovial sano (Figura IV.12).



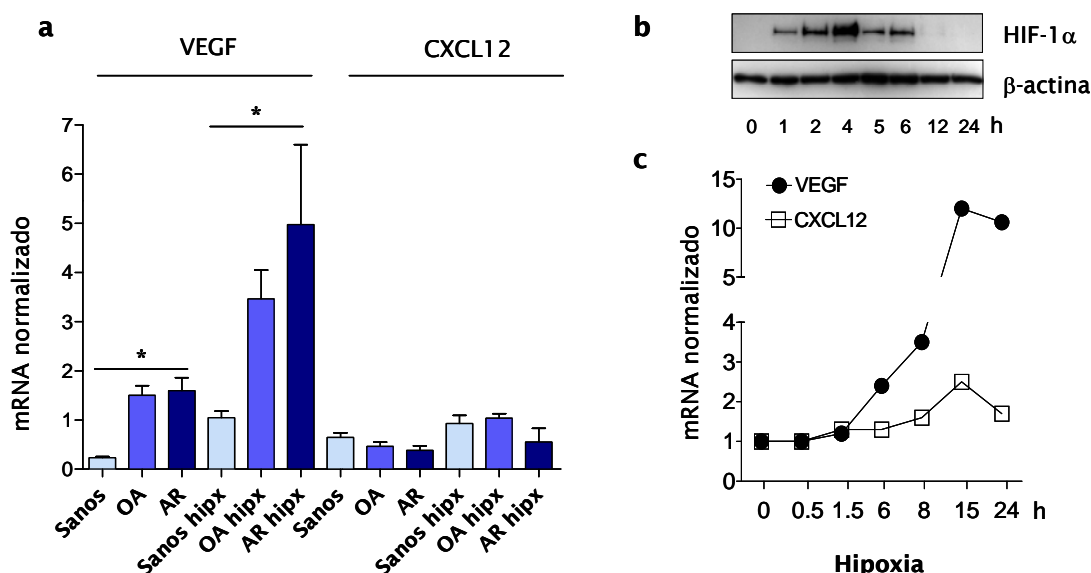
**Figura IV.11. Análisis de la capacidad de los fibroblastos inflamatorios humanos de inducir angiogénesis y reclutar células.** (a) Tinción con hematoxilina-eosina de implantes de matrigel acelulares (PBS, controles) o con fibroblastos de AR, mostrand estructuras vasculares e infiltrados celulares (x100) (b) Las estructuras vasculares se identifican mediante inmunoperoxidasa de las células endoteliales (CE) con CD31 y de pericitos con aSMA. (c) Marcaje inmunofluorescente de infiltrados perivascuales de células mononucleares mediante el marcador de células mieloides CD11b, CD31 y contratinción con DAPI. (d) Panel superior: localización en el matrigel de los fibroblastos transducidos con la proteína verde fluorescente (GFP). Panel inferior: fibroblastos sin GFP (control). (x400).



**Figura IV.12. Cuantificación de la infiltración celular y angiogénesis.** (a) Inmunomarcaje de los vasos CD31<sup>+</sup> (verde) en los implantes de matrigel con fibroblastos de AR o sanos (x100, contratinción con DAPI). (b) Cuantificación del infiltrado del número de células (núcleos DAPI<sup>+</sup>) y vasos CD31<sup>+</sup> sobre imágenes digitalizadas de los implantes de matrigel que contenían fibroblastos inflamatorios de 11 pacientes con AR o 9 pacientes con OA o implantes con fibroblastos de 7 sujetos sanos. Las barras representan la media ± ESM (error estándar de la media). Células/campo: \*P< 0,05 fibroblastos de OA o AR *versus* sanos; vasos/campo: \*P< 0,05 fibroblastos de AR *versus* OA o sanos.

### 3.2 Aumento de la expresión de VEGF por hipoxia en fibroblastos sinoviales.

Estudios previos en otros modelos han identificado a VEGF y CXCL12 como dos de los factores derivados de fibroblastos críticos para la angiogénesis y el reclutamiento de células mieloides [9-10]. Para analizar si las diferencias en la angiogénesis o en el reclutamiento de células mieloides fueron debidas a diferencias en la expresión de CXCL12 o VEGF entre fibroblastos sanos e inflamatorios se cuantificó la expresión de mRNA de CXCL12 y VEGF en los distintos grupos de fibroblastos. Se observaron niveles constitutivos de expresión de VEGF más elevados en los fibroblastos inflamatorios (AR y OA) comparados con los niveles de fibroblastos sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de CXCL12 entre los diferentes grupos (Figura IV.13a). Tampoco se detectaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de CXCL12 y VEGF entre los fibroblastos de AR y OA. Por este motivo se utilizaron fibroblastos de pacientes con AR para los estudios posteriores.



**Figura IV.13. Expresión constitutiva e inducible por hipoxia de VEGF y CXCL12, y activación de HIF-1α en los fibroblastos inflamatorios.** (a) Cuantificación por PCR cuantitativa de la expresión de mRNA VEGF y CXCL12 de fibroblastos cultivados en condiciones de normoxia o hipoxia (15 horas 0,5% O<sub>2</sub>). Los resultados se normalizaron con los valores de mRNA de β-actina. AR: fibroblastos obtenidos de 11 pacientes con AR; OA: fibroblastos de 9 pacientes con OA; Sanos: fibroblastos de 7 sujetos sanos. \*P<0,05 AR *versus* Sanos. Las barras muestran la media ± ESM. (b) Acumulación de HIF-1α de fibroblastos de AR en condiciones de hipoxia a diversos tiempos analizada por Western blotting. (c) Ratios hipoxia/normoxia de la expresión de VEGF y CXCL12 a distintos tiempos de una línea representativa de fibroblastos de AR.

Los implantes avasculares de matrigel representan un ambiente hipóxico similar al del tejido sinovial inflamatorio [11-13]. Para simular estas condiciones en cultivo, se analizó la expresión y regulación de HIF-1 α, VEGF y CXCL12 en condiciones de hipoxia en los distintos grupos de fibroblastos. En los fibroblastos incubados bajo una atmósfera al 0,5% de O<sub>2</sub>, se detectó una acumulación de HIF-1α similar a la descrita previamente en otras células [215]. La acumulación de HIF-1α fue paralela en el tiempo a una potente inducción de la expresión de mRNA VEGF (Figura IV.13b y c). Aunque la magnitud de la respuesta a hipoxia fue similar en los fibroblastos inflamatorios (AR y OA) y los sanos, la expresión absoluta de VEGF fue altamente significativa en los fibroblastos inflamatorios comparados con los sanos (Figura IV.13a). Además, se observó que en condiciones de hipoxia los niveles del mRNA VEGF de los fibroblastos de pacientes con OA eran ligeramente menores al de los fibroblastos de pacientes con AR, aunque en este caso las diferencias no eran estadísticamente significativas. CXCL12 fue también inducido por la hipoxia aunque en menor medida, y los niveles de expresión absoluta de CXCL12 fueron similares en todos los grupos de fibroblastos en hipoxia o normoxia (Figura IV.13).

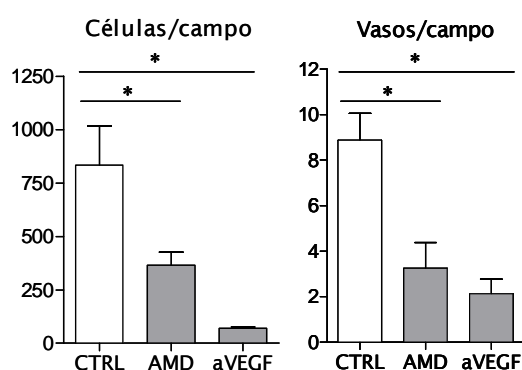


### 3.3 Inhibición de la angiogénesis y el reclutamiento celular inducido por fibroblastos inflamatorios por antagonistas de VEGF o CXCL12.

Para confirmar la participación de VEGF y CXCL12 producidos por los fibroblastos sobre el reclutamiento de células mieloides y la angiogénesis, se analizaron *in vivo* los efectos de sus antagonistas específicos.

En tumores humanos injertados en ratones se ha demostrado que la neutralización de la expresión del VEGF humano (pero no murino) mediante el anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano bevacizumab reduce la angiogénesis [216]. Con una sola inyección IP de bevacizumab simultánea al implante de fibroblastos, se observó un fuerte efecto inhibitorio reduciéndose significativamente tanto el infiltrado celular como el número de vasos en los implantes (Figura IV.14).

Análogamente, se observó una disminución del infiltrado celular y de la angiogénesis en los ratones que recibieron bicyclam AMD3100, el antagonista del receptor CXCR4, por vía IP cada 24 horas (Figura IV.14). Por lo tanto, el antagonista de VEGF y el de CXCL12/CXCR4 fueron capaces de reducir la infiltración celular y la angiogénesis, confirmando la importancia de ambos factores en este proceso.

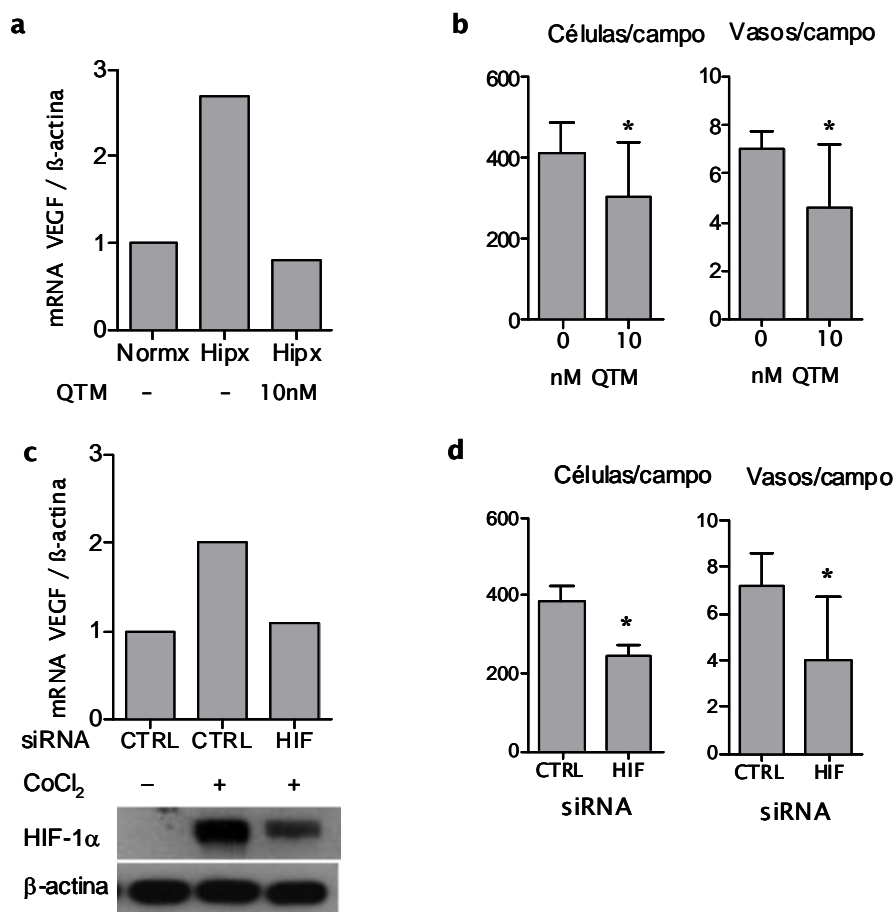


**Figura IV.14 Disminución de la infiltración celular y de la angiogénesis por los antagonistas de VEGF y CXCL12.** Se cuantificaron las células (núcleos DAPI<sup>+</sup>) y los vasos (CD31<sup>+</sup>) por campo de los matriges con fibroblastos de pacientes con AR extraídos de ratones a los que se inyectó el anticuerpo monoclonal anti-VEGF (aVEGF) o el antagonista de CXCL12 AMD3100 (AMD). Las barras muestran los resultados representativos (media ± ESM) de 1 de los 3 experimentos independientes realizados, usando 2 líneas diferentes de fibroblastos de pacientes con AR, en grupos de al menos 5 ratones. \*P< 0,05 *versus* control sin tratar (CTRL).

### **3.4 Inhibición de la angiogénesis y el reclutamiento celular inducido por fibroblastos inflamatorios por antagonistas o siRNA de HIF.**

Puesto que los factores derivados de fibroblastos VEGF y CXCL12 contribuyen a la infiltración celular y a la angiogénesis mediada por fibroblastos inflamatorios y son inducibles por hipoxia [201, 217-218], se decidió investigar por un lado, el efecto del bloqueo de la transcripción dependiente de HIF mediante la molécula quetomina y por otro, bloquear la expresión de HIF-1 $\alpha$  transduciendo los fibroblastos con un lentivirus de expresión de siRNA específico del mRNA de HIF [209, 215].

El tratamiento de los cultivos de fibroblastos con el antagonista quetomina a concentraciones  $\geq 50$  nM provocaba una alta citotoxicidad (datos no mostrados), aunque concentraciones más altas han sido citadas como no citotóxicas en otros tipos celulares [21]. A una concentración no citotóxica de 10 nM, la quetomina era todavía capaz de suprimir la inducción del mRNA de VEGF en respuesta a hipoxia (Figura IV.15a). Se observó una disminución del infiltrado celular y de la angiogénesis en los implantes de matrigel que contenían fibroblastos AR con 10 nM de quetomina (Figura IV.15b). De forma similar, el bloqueo específico de HIF-1 $\alpha$  por transducción lentiviral con siRNA redujo notablemente la acumulación de HIF1- $\alpha$  y la expresión de mRNA de VEGF en respuesta a la hipoxia o al CoCl<sub>2</sub> (Figura IV.15c). Los implantes de fibroblastos de AR transducidos con el siRNA de HIF-1 $\alpha$  mostraron una disminución significativa tanto del infiltrado celular como de la angiogénesis comparados con los fibroblastos transducidos con un control siRNA (Figura IV.15d).



**Figura IV. 15. Inhibición de la expresión de VEGF inducible por hipoxia y de la infiltración celular y angiogénesis en fibroblastos de pacientes con AR utilizando quetomina o inhibiendo específicamente HIF-1 con un siRNA de interferencia.** (a y b) Se trataron cultivos de fibroblastos de pacientes con AR con 10 nM de quetomina (QTM) o el vehículo control, DMSO (0 nM QTM) y después se mantuvieron en cultivo en normoxia o hipoxia (0,5% O<sub>2</sub>). (a) Expresión del mRNA VEGF por qPCR y normalizada con la expresión de mRNA de  $\beta$ -actina de una línea representativa de fibroblastos. (b) Cuantificación de la infiltración celular (núcleos DAPI<sup>+</sup>) o de la densidad vascular (vasos CD31<sup>+</sup>) en los implantes de matrigel con los fibroblastos AR tratados con 10 nM de quetomina o el vehículo control. (c y d) Los fibroblastos de pacientes AR transducidos con siRNA control o siRNA HIF se cultivaron 4 horas con 300  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> para simular la hipoxia. (c) Análisis de la expresión de una línea representativa de fibroblastos del mRNA de VEGF por qPCR normalizada con la expresión de mRNA de  $\beta$ -actina y de la expresión de proteína HIF1- $\alpha$  por Western blotting. (d) Cuantificación de la infiltración celular o de la densidad vascular en los implantes de matrigel con los fibroblastos de pacientes AR transducidos. Las barras en “b” y “d” muestran la media  $\pm$  ESM, resultado de al menos 5 ratones por grupo. Los resultados de “a-d” son de 1 experimento representativo de 4 experimentos independientes, cada uno usando una línea diferente de fibroblastos AR. \* P<0,05 *versus* Control.



## **V. DISCUSIÓN**

---



## 1 EXPANSIÓN DE LOS FIBROBLASTOS EN LA SINOVIAL REUMATOIDE

Durante las últimas décadas, numerosos estudios señalan a los fibroblastos como componentes celulares activos en la inflamación sinovial y de la destrucción articular reumatoide [52-54, 219-221]. La mayoría de estos trabajos estudian los cambios en la expresión de diferentes genes y su fenotipo en comparación con fibroblastos normales. Estos cambios fenotípicos intentan explicar la transición de los fibroblastos con funciones homeostáticas hacia células pro-inflamatorias y con capacidad destructiva.

Además de estos cambios, se ha descrito tradicionalmente la expansión o hiperplasia de estas células en la sinovial reumatoide comparada con tejidos artrósicos o normales. Sin embargo, esta descripción se basa en observaciones morfológicas que señalan una hiperplasia o aumento en el número de capas del *lining* en tejidos reumatoides [60, 222]. Esta variación del grosor del *lining* se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad y puede disminuir después de una terapia efectiva [60, 223-225]. Sin embargo, la mayoría de las células de esta área son macrófagos y la reducción puede deberse a la disminución de los macrófagos del *lining* [222, 224]. En el *sublining*, donde las interacciones entre los linfocitos y las células del estroma parecen importantes [226-227], no se han descrito cambios en el componente fibroblástico debido a la falta de marcadores específicos.

Nuestro estudio confirma la utilidad del marcaje de la chaperona hsp47 como un buen marcador de linaje fibroblástico que permite su cuantificación en el tejido sinovial. Este marcador nos ha permitido obtener datos cuantitativos sobre las áreas de fibroblastos del *lining* y del *sublining* para poder estudiar correlaciones con los cambios clínicos y terapéuticos.

Nuestro análisis demuestra que ambos grupos de fibroblastos están significativamente expandidos incluso en las biopsias de menos de 1 año si se comparan con los tejidos sinoviales normales. Sin embargo, hemos encontrado importantes diferencias entre ambas subpoblaciones. El área fibroblástica del *lining* aumenta en paralelo a la duración de la enfermedad y correlaciona con una mayor actividad inflamatoria. En cambio los fibroblastos del *sublining* se comportan de forma opuesta. La hiperplasia del *lining* sinovial no es específica de la AR, y fue similar a la observada en tejidos de pacientes con OA en estadios avanzados, lo que es consistente con observaciones previas [222]. Por el contrario, la hiperplasia de los fibroblastos del *sublining* es una característica

específica de la AR y no se ha observado en tejidos de pacientes con OA. Por lo tanto, los fibroblastos del *lining* y del *sublining* también parecen seguir una dinámica diferente en ambas enfermedades. Estudios previos han demostrado que los marcadores de fibroblastos estudiados hasta ahora como cadherina-11, VCAM o DAF (CD55) presentan diferencias de expresión entre los fibroblastos del *lining* y del *sublining* [63-64, 67-68]. Esto puede deberse a la expresión inducible de estos marcadores por mediadores pro-inflamatorios presentes en la AR como el TNF- $\alpha$  [62, 65-66]. Es posible que los fibroblastos del *sublining* adquieran en la AR un fenotipo similar a los del *lining* o que exista un intercambio entre ambas subpoblaciones, lo que podría explicar la proporción inversa de ambos subtipos de fibroblastos observada a lo largo de la enfermedad.

La posibilidad de actuar específicamente sobre los fibroblastos en la AR ha sido explorada en modelos animales de inflamación articular, en los que utilizando ratones con fibroblastos deficientes en el receptor I del TNF o en la molécula de adhesión homotípica cadherina-11, se frena el desarrollo de la artritis [80, 228]. Los fibroblastos de los ratones deficientes en cadherina-11, no forman la estructura típica de hiperplasia sinovial que se observa en las articulaciones inflamadas. Además, estos fibroblastos tienen disminuida la capacidad de migración e invasión del cartílago [80]. Estos resultados son consistentes con la importante contribución de estas células al proceso inflamatorio y a la destrucción de la articulación.

Las terapias biológicas usadas actualmente para el tratamiento de la AR actúan sobre las citoquinas inflamatorias o sobre los linfocitos, reduciendo el infiltrado inflamatorio sinovial y mejorando significativamente los síntomas. Sin embargo, sus efectos indirectos sobre la hiperplasia de fibroblastos no habían sido previamente confirmados, posiblemente por las limitaciones en los métodos de detección puramente morfológicos anteriormente mencionados [223-225]. Los efectos de los antagonistas de TNF- $\alpha$  son particularmente importantes ya que TNF- $\alpha$ , además de ser un factor crítico en la respuesta pro-inflamatoria y en la destrucción tisular, es también un factor de proliferación y supervivencia para los fibroblastos [48, 219, 228-229]. Nuestros datos demuestran una reducción del área fibroblástica del *lining*, pero no del *sublining*, en respuesta a la terapia anti-TNF- $\alpha$ . Sin embargo, no hemos podido confirmar el paralelismo entre este cambio y la respuesta al tratamiento. Esto puede ser por el pequeño número de pacientes no-respondedores o por efectos subclínicos de la terapia



en estos pacientes. Se ha demostrado que incluso en ausencia de respuesta clínica, el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  reduce la progresión de la destrucción articular [230].

No se conocen los mecanismos que originan la acumulación de los fibroblastos en el *lining*, pero existen dos mecanismos potenciales, no mutuamente excluyentes. Por una parte podrían provenir del reclutamiento de células mesenquimales circulantes más o menos diferenciadas [47]. Por otra, algunos datos sugieren que existe proliferación local o un desequilibrio entre la proliferación y apoptosis en la sinovial reumatoide [48-51].

La reducción de la hiperplasia del *lining* después de la terapia podría estar relacionada con la disminución de la supervivencia de los fibroblastos o del reclutamiento de precursores [228-229]. La proliferación en el *lining* sinovial es difícil demostrar, se detectan pocas células que expresen marcadores del ciclo celular y un número limitado de mitosis, lo que sugiere que la síntesis de DNA no es la principal causa de la hiperplasia [231]. El ambiente sinovial en la AR puede promover la supervivencia de los fibroblastos aumentando su resistencia a la muerte por apoptosis. Sin embargo, no hemos podido detectar un aumento en los niveles de apoptosis en los pacientes tratados con anti-TNF- $\alpha$ , pero esto puede deberse a los infrecuentes que son los eventos apoptóticos en los fibroblastos, en comparación con los infiltrados linfoides o el endotelio (datos no presentados).

Comparativamente con el tejido sinovial normal, la hiperplasia sinovial sigue estando significativamente incrementada incluso después de la terapia. El significado clínico de la persistencia de la hiperplasia sinovial deberá ser analizado por estudios longitudinales adicionales.

## 2 CAMBIOS VASCULARES EN LA SINOVIAL REUMATOIDE

La presencia de vasos sanguíneos inmaduros, carentes de envuelta pericitaria, es un fenómeno previamente asociado a tumores o al desarrollo de procesos en los que hay una angiogénesis muy activa [142, 232]. La inducción de angiogénesis por un exceso de VEGF se ha relacionado con este desequilibrio entre el crecimiento de las células endoteliales y el desarrollo paralelo de una envuelta de pericitos [144]. En la AR, el ambiente hipóxico y la presencia de algunas citoquinas inducen la activación de HIF, un mediador transcripcional de la activación de VEGF así como de otros genes pro-

angiogénicos [123, 146-147, 201]. El exceso de VEGF parece uno de los factores clave que podrían explicar el aumento de angiogénesis en los tejidos sinoviales reumatoides [120-121, 129, 233-234].

Nuestras observaciones muestran vasos sanguíneos inmaduros en el tejido inflamatorio de AR, lo que representa la primera descripción de esta anomalía vascular en una enfermedad inflamatoria crónica. En un pequeño porcentaje de los tejidos de pacientes con OA se detectaron algunos vasos inmaduros, pero estos no se observaron en tejidos sinoviales normales. Este dato sugiere que la presencia de vasos inmaduros y de angiogénesis activa no son completamente específicos de ésta enfermedad y podrían asociarse a la severidad de la inflamación. En la OA, de forma variable puede observarse un proceso inflamatorio menos severo, y un aumento del remodelamiento vascular [117-119]. Un estudio posterior ha confirmado nuestra observación de vasos inmaduros en la AR [235].

En la AR el aumento de la densidad vascular y la presencia de vasos inmaduros se detectó desde fases precoces (<1 año de evolución) pero su densidad aumentó con la duración de la enfermedad, siendo máxima en los grupos con erosiones y enfermedad activa de larga duración. Además, la correlación significativa entre la infiltración sinovial por linfocitos y la formación de vasos inmaduros indican un posible vínculo entre ambos procesos.

En las biopsias de pacientes con AR tomadas después de la terapia con anti-TNF- $\alpha$ , se observó una importante depleción de vasos inmaduros, principalmente en los pacientes que consiguieron una buena respuesta terapéutica. Por otra parte, el aumento en la densidad de vasos maduros en los tejidos reumatoides parece estar presente desde fases tempranas y es menos susceptible a cambios. Después de la terapia con anti-TNF- $\alpha$ , no se observaron cambios en la densidad de vasos maduros paralelos a los observados en los vasos inmaduros. De esta forma, sólo el área CD31<sup>+</sup>, y no el área  $\alpha$ SMA<sup>+</sup>, disminuyó con la terapia anti-TNF- $\alpha$ . Estos datos junto con observaciones previas realizadas sobre los efectos de la terapia en marcadores de angiogénesis locales o sistémicos, sugieren que la terapia efectiva detiene la angiogénesis activa pero tiene poco efecto sobre los vasos maduros [123, 150-151].

En los pacientes más refractarios es posible que la acción de la terapia anti-TNF- $\alpha$  sea insuficiente para modificar el desarrollo de nuevos vasos o de vasos inmaduros. Su

persistencia después de la mejoría de la inflamación clínica podría ser un factor de cronicidad y de daño articular [152-154]. Hasta ahora no se ha estudiado si existe alguna relación entre la señal vascular observada por técnicas de imagen como la ecografía *doppler* y la presencia de vasos inmaduros o la densidad vascular total. Por lo tanto, para evaluar la contribución de la persistencia de los vasos inmaduros y/o maduros al progreso de la enfermedad será necesario realizar estudios histológicos y de imagen en paralelo.

En cáncer, se ha observado que las terapias anti-angiogénicas con anti-VEGF inducen cambios selectivos en la fracción vascular inmadura tumoral, un proceso denominado “normalización vascular”, en el cual los vasos inmaduros desaparecen [142, 145]. Estos datos son consistentes con la diferente sensibilidad a la privación de VEGF de vasos maduros o inmaduros. Mientras el VEGF es necesario para la formación de nuevos vasos, éste factor es prescindible para la supervivencia de la red vascular madura [142]. La disminución en los niveles de VEGF, indirectamente inducida por la terapia anti-TNF- $\alpha$  en la AR [123, 148-149], podría relacionarse por tanto con la normalización vascular aquí observada más que a una reducción de la vasculatura global como se había sugerido [236]. Es posible por tanto que los antagonistas de VEGF tampoco sean activos sobre la mayor parte de la vasculatura sinovial. En un modelo animal de angiogénesis inflamatoria de las vías respiratorias, se han identificado efectos angiogénicos de TNF- $\alpha$  independientes de VEGF, sugiriendo la existencia de otros mediadores alternativos que podrían también estar relacionados con la disminución de la angiogénesis inflamatoria inducida por el bloqueo del TNF- $\alpha$  [237].

Aunque la reducción de los vasos inmaduros ocurrió preferentemente en los pacientes que respondieron a la terapia anti-TNF- $\alpha$ , los efectos pleiotrópicos de esta intervención no permiten especular sobre el posible papel de la eliminación de estos vasos inmaduros en tal respuesta. En el cáncer, los vasos inmaduros están asociados a un aumento de la permeabilidad y una mayor presión del fluido intersticial, lo que disminuye la perfusión de los tejidos y el acceso de los fármacos, y modifica el patrón de células inflamatorias [141-143, 238].

El papel de los vasos inmaduros en la inflamación sólo se había explorado en un modelo murino de inflamación de la vía respiratoria inducido por *Mycoplasma* [239]. En este modelo, la presencia de vasos inmaduros está directamente relacionada con una mayor infiltración leucocitaria y una mayor expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

Para conocer el potencial de futuras intervenciones específicas anti-angiogénicas en la AR, será necesario estudiar la contribución específica de los vasos inmaduros.

### 3 FENOTIPO PRO-ANGIOGÉNICO DE LOS FIBROBLASTOS REUMATOIDES

Los fibroblastos son las células residentes más abundantes de la sinovial reumatoide. En diversos trabajos se ha sugerido que los fibroblastos de la AR adquieren un fenotipo anormal y heredable, que incluye una mayor capacidad de invadir y destruir cartílago, y una expresión alterada de citoquinas y quimioquinas [220, 240-241]. Sin embargo, las condiciones de cultivo de los tejidos pueden modificar significativamente la expresión genética y el fenotipo de los fibroblastos, en concreto la concentración de oxígeno es muy diferente a la de los tejidos sinoviales *in vivo*, donde hay un ambiente hipóxico. Nuestros resultados demuestran que los fibroblastos de la AR bajo condiciones de hipoxia *ex vivo* y en ausencia de estímulos adicionales, inducen el reclutamiento de células mieloides y el desarrollo de vasos sanguíneos, una capacidad previamente observada en el estroma del cáncer y que tiene amplias implicaciones en la perpetuación de la inflamación crónica [204, 242-243].

Se han encontrado múltiples factores quimiotácticos sobreexpresados por los fibroblastos inflamatorios, lo que podría contribuir al reclutamiento de leucocitos [241, 244]. El aumento en la expresión de VEGF explicaría parcialmente el fenotipo pro-angiogénico observado en los fibroblastos. El marcado efecto del antagonista de VEGF en la angiogénesis y el reclutamiento de células mieloides confirma la relevancia local de este factor en ambos procesos. En la AR, los niveles locales y sistémicos de VEGF están incrementados, y durante la respuesta a la terapia se reducen rápidamente [148, 234, 245]. Sin embargo, no se ha descrito previamente un aumento en la expresión de VEGF en los fibroblastos de pacientes con AR en cultivo, posiblemente debido al uso como control de fibroblastos de pacientes con OA y no de individuos sanos [201]. Ambos grupos de fibroblastos (OA y AR) estaban caracterizados por una capacidad pro-angiogénica aumentada, que por tanto parece más una respuesta originada en el ambiente inflamatorio crónico que un proceso específico de la enfermedad. La OA es considerada una enfermedad inflamatoria de menor grado, pero el remodelamiento vascular y la inflamación también parecen contribuir a la destrucción articular [119, 246].

A pesar de que los fibroblastos inflamatorios no expresaron la quimioquina CXCL12 en exceso, el antagonista de su receptor específico CXCR4 fue capaz de disminuir el reclutamiento celular y la angiogénesis. Por lo tanto, los dos factores derivados de fibroblastos, VEGF y CXCL12, parecen ser necesarios para el reclutamiento de las células mieloides y la angiogénesis. En un modelo transgénico de sobreexpresión órgano-específica de VEGF/CXCL12, ambos factores mostraron funciones complementarias en el reclutamiento y retención de células mieloides perivasculares, componentes necesarios para la respuesta angiogénica [136]. Previamente habíamos identificado a CXCL12 como uno de los factores responsables de la actividad angiogénica del líquido sinovial de la AR [100]. Aunque los fibroblastos son la fuente principal de CXCL12 en la sinovial reumatoide, no hemos encontrado correlación entre el aumento de la expresión de CXCL12 y la capacidad pro-angiogénica de los fibroblastos inflamatorios [247], lo que es consistente con resultados de estudios anteriores [100, 201, 248]. Por lo tanto la diferenciación patológica de los fibroblastos parece heterogénea y puede dirigirse hacia un fenotipo pro-angiogénico mediante diferentes vías moleculares.

#### **4 FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN EL FENOTIPO PRO-ANGIOGÉNICO DE LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES INFLAMATORIOS**

Las principales vías biológicas modificadas por la hipoxia en los fibroblastos están relacionadas con HIF-1 $\alpha$ . En modelos animales de inflamación donde se eliminó el HIF-1 $\alpha$  de las células del linaje mieloide, se consiguió reducir la infiltración celular posiblemente como resultado de cambios metabólicos, limitando la capacidad migratoria de las células mieloides [200]. VEGF y CXCL12, dianas transcripcionales de HIF en condiciones de hipoxia [218, 249], representan un nexo adicional entre la hipoxia y la infiltración por células inflamatorias. Nuestros resultados muestran que la respuesta de las células residentes a la hipoxia es también crítica para el reclutamiento de células inflamatorias a través de la síntesis de factores quimiotácticos y pro-angiogénicos como VEGF. Por lo tanto, eliminando las respuestas mediadas por HIF podríamos revertir parcialmente la contribución de los fibroblastos a la perpetuación de la artritis crónica. En nuestro modelo, la inhibición de la actividad transcripcional de HIF y de la expresión de HIF por un siRNA específico tienen efectos similares. Se han descrito gran variedad

de compuestos dirigidos contra HIF, pero ninguno ha demostrado suficiente especificidad [250]. En nuestro modelo experimental, usamos la molécula quetomina que es el inhibidor transcripcional de HIF/p300 más potente conocido a concentraciones no citotóxicas [251]. No se han evaluado otros efectos o actividades biológicas adicionales de este inhibidor específico de la transcripción.

Los datos actuales muestran que las terapias dirigidas a un único componente celular del sistema inmune no son capaces de curar definitivamente la enfermedad. Las terapias para la AR están dirigidas contra células T, células B, o citoquinas macrofágicas. Todas estas intervenciones disminuyen la actividad de la enfermedad y retardan la destrucción articular. Sin embargo, la retirada de las terapias provoca una recaída de la enfermedad en todos los casos. En trabajos previos se ha observado una reducción, similar con las diferentes terapias, de la infiltración celular linfoide y de los macrófagos en la membrana sinovial [214, 252-253]. En este estudio hemos demostrado que además existe una reducción significativa, pero no completa, en el área fibroblástica y en la fracción vascular inmadura.

Nuestros datos subrayan la importancia del fibroblasto sinovial en la patogenia de la AR debido en parte a su fenotipo pro-angiogénico y a su capacidad de reclutar células mieloides. La persistencia de la hiperplasia fibroblástica tras el tratamiento podría explicar la progresión y reactivación de la enfermedad que suelen acompañar a la suspensión de las terapias. En la AR no hay ninguna terapia disponible específicamente dirigida contra los fibroblastos o la respuesta vascular. Eliminar los factores pro-angiogénicos derivados de los fibroblastos o la respuesta transcripcional de HIF son enfoques alternativos para reducir la participación de los fibroblastos en la respuesta inflamatoria crónica.

## **VI. CONCLUSIONES**

---





1. La detección inmunohistoquímica de hsp47 como marcador fibroblástico permite realizar estudios cuantitativos de este componente celular en el tejido sinovial normal o patológico.
2. El área fibroblástica del *lining* sinovial es similar en la AR y en la OA y está aumentada comparado con tejidos de controles sanos, pero la hiperplasia fibroblástica del *sublining* sólo se observa en los tejidos de pacientes con AR.
3. La expansión de los fibroblastos del *lining* se incrementa paralelamente a la actividad y a la progresión de la enfermedad. Los fibroblastos del *sublining* se comportan de forma opuesta. Sólo el área fibroblástica del *lining* se reduce significativamente tras la terapia con antagonistas del TNF- $\alpha$ .
4. Existe un aumento importante de la vascularización en el tejido sinovial de los pacientes con AR en comparación con el tejido sinovial de los pacientes con OA o de los controles sanos. En el tejido sinovial de los pacientes con AR se observan numerosos vasos inmaduros. Sólo en algún caso se observaron vasos inmaduros en tejidos artrósicos y no se observaron en tejidos normales.
5. En los pacientes con AR, la densidad de vasos inmaduros, pero no la de vasos maduros, aumenta con la progresión de la enfermedad. Sólo los vasos inmaduros mostraron una reducción en respuesta a la terapia anti-TNF- $\alpha$ .
6. La inflamación sinovial crónica está asociada a cambios estables en los fibroblastos que resultan en una capacidad aumentada de reclutar células mieloides y de inducir angiogénesis cuando se implantan en ratones inmunodeficientes. Esta capacidad se asocia a una sobreexpresión de VEGF.
7. La inducción de procesos de reclutamiento mieloide y angiogénesis por los fibroblastos sinoviales dependen del eje HIF, VEGF y CXCL12/CXCR4; y la antagonización de cualquiera de estos tres elementos es capaz de bloquearlos.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Bresnihan B T.P.B. *Synovial tissue analysis in rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol. 1999 13((4)): p. 645-59.
2. De Blecourt J.J. *Screening of the population for rheumatic diseases*. Ann Rheum Dis. 1954. 13(4): p. 338-40.
3. Kalla A.A., y Tikly M. *Rheumatoid arthritis in the developing world*. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2003. 17(5): p. 863-75.
4. Kwoh C.K. *Epidemiology of the rheumatic diseases*. Curr Opin Rheumatol. 1992. 4(2): p. 138-44.
5. Carmona L., Villaverde V., Hernandez-Garcia C., Ballina J., Gabriel R., y Laffon A. *The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain*. Rheumatology (Oxford). 2002. 41(1): p. 88-95.
6. Sweeney S.E., y Firestein G.S. *Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation*. Int J Biochem Cell Biol. 2004. 36(3): p. 372-8.
7. Gregersen P.K., Silver J., y Winchester R.J. *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1987. 30(11): p. 1205-13.
8. Wandstrat A., y Wakeland E. *The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes*. Nat Immunol. 2001. 2(9): p. 802-9.
9. Saal J.G., Krimmel M., Steidle M., Gerneth F., Wagner S., Fritz P., Koch S., y col. *Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope*. Arthritis Rheum. 1999. 42(7): p. 1485-96.
10. Muller-Ladner U., Gay R.E., y Gay S. *Retroviral sequences in rheumatoid arthritis synovium*. Int Rev Immunol. 1998. 17(5-6): p. 273-90.
11. Vaughan J.H. *Infection and rheumatic diseases: a review (2)*. Bull Rheum Dis. 1990. 39(2): p. 1-8.
12. Liao K.P., Alfredsson L., y Karlson E.W. *Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol. 2009. 21(3): p. 279-83.
13. Bang S.Y., Lee K.H., Cho S.K., Lee H.S., Lee K.W., y Bae S.C. *Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status*. Arthritis Rheum. 2010. 62(2): p. 369-77.
14. Stahl E.A., Raychaudhuri S., Remmers E.F., Xie G., Eyre S., Thomson B.P., Li Y., y col. *Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci*. Nat Genet. 2010. 42(6): p. 508-14.
15. Edwards J.C. *Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis*. Arthritis Res. 2000. 2(5): p. 344-7.
16. Mor A., Abramson S.B., y Pillinger M.H. *The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction*. Clin Immunol. 2005. 115(2): p. 118-28.
17. Van Den Berg W.B., y Bresnihan B. *Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1*. Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol. 1999. 13(4): p. 577-97.

18. Iguchi T., y Ziff M. *Electron microscopic study of rheumatoid synovial vasculature. Intimate relationship between tall endothelium and lymphoid aggregation.* J Clin Invest. 1986. 77(2): p. 355-61.
19. Helder A.E., Feltkamp-Vroom T.M., y Nienhuis R.L. *Electron and light microscopical observations and serological findings in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis. 1973. 32(6): p. 515-23.
20. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P.J., Cofield R.H., O'fallon W.M., Goronzy J.J., y col. *Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis.* J Immunol. 2001. 167(2): p. 1072-80.
21. Humby F., Bombardieri M., Manzo A., Kelly S., Blades M.C., Kirkham B., Spencer J., y col. *Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium.* PLoS Med. 2009. 6(1): p. e1.
22. Qu Z., Garcia C.H., O'rourke L.M., Planck S.R., Kohli M., y Rosenbaum J.T. *Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining.* Arthritis Rheum. 1994. 37(2): p. 212-20.
23. Szekanecz Z., y Koch A.E. *Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'.* Arthritis Res Ther. 2008. 10(5): p. 224.
24. Juan D. Cañete Crespillo J.J.G.-R.C., Miguel Ángel Gonzalez-Gay Mantecón, Gabriel Herrero-Beaumont Ceunca, Luis Morillas López, José Luis Pablos Álvarez, Raimon Sanmartí Sala, ed. *Manual SER de las Enfermedades Reumáticas.* 5ª ed. 2008, Editorial Médica Panamericana: Madrid. 482.
25. Firestein G.S. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis.* Nature. 2003. 423(6937): p. 356-61.
26. Monach P.A., Benoist C., y Mathis D. *The role of antibodies in mouse models of rheumatoid arthritis, and relevance to human disease.* Adv Immunol. 2004. 82: p. 217-48.
27. Sakaguchi S., y Sakaguchi N. *Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system.* Curr Opin Immunol. 2005. 17(6): p. 589-94.
28. Kremer J.M., Westhovens R., Leon M., Di Giorgio E., Alten R., Steinfeld S., Russell A., y col. *Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig.* N Engl J Med. 2003. 349(20): p. 1907-15.
29. Chabaud M., Durand J.M., Buchs N., Fossiez F., Page G., Frappart L., y Miossec P. *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium.* Arthritis Rheum. 1999. 42(5): p. 963-70.
30. Ziolkowska M., Koc A., Luszczkiewicz G., Ksiezopolska-Pietrzak K., Klimczak E., Chwalinska-Sadowska H., y Maslinski W. *High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism.* J Immunol. 2000. 164(5): p. 2832-8.
31. Chabaud M., Fossiez F., Taupin J.L., y Miossec P. *Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines.* J Immunol. 1998. 161(1): p. 409-14.

32. Leonard W.J., y Spolski R. *Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation*. Nat Rev Immunol. 2005. 5(9): p. 688-98.
33. Mehta D.S., Wurster A.L., y Grusby M.J. *Biology of IL-21 and the IL-21 receptor*. Immunol Rev. 2004. 202: p. 84-95.
34. Van Amelsfort J.M., Jacobs K.M., Bijlsma J.W., Lafeber F.P., y Taams L.S. *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid*. Arthritis Rheum. 2004. 50(9): p. 2775-85.
35. Leipe J., Skapenko A., Lipsky P.E., y Schulze-Koops H. *Regulatory T cells in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther. 2005. 7(3): p. 93.
36. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M., y Lipsky P.E. *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells*. Blood. 2006. 108(1): p. 253-61.
37. Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D.A., y Mauri C. *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. J Exp Med. 2004. 200(3): p. 277-85.
38. Dorner T., y Burmester G.R. *The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets*. Curr Opin Rheumatol. 2003. 15(3): p. 246-52.
39. Franklin E.C., Holman H.R., Muller-Eberhard H.J., y Kunkel H.G. *An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis*. J Exp Med. 1957. 105(5): p. 425-38.
40. Cantaert T., De Rycke L., Bongartz T., Matteson E.L., Tak P.P., Nicholas A.P., y Baeten D. *Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient!* Arthritis Rheum. 2006. 54(11): p. 3381-9.
41. Tsoulfa G., Rook G.A., Van-Embden J.D., Young D.B., Mehler A., Isenberg D.A., Hay F.C., y col. *Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 1989. 48(2): p. 118-23.
42. Klareskog L., y Olsson T. *Autoimmunity to collagen II and myelin basic protein: comparative studies in humans and rodents*. Immunol Rev. 1990. 118: p. 285-310.
43. Lydyard P.M., Tsoulfa G., Sharif M., Broker B., Smith M., y Rook G.A. *Immunity to heat shock proteins in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol. 1990. 8 Suppl 5: p. 69-74.
44. Silverman G.J., y Weisman S. *Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy*. Arthritis Rheum. 2003. 48(6): p. 1484-92.
45. Lafyatis R., Remmers E.F., Roberts A.B., Yocum D.E., Sporn M.B., y Wilder R.L. *Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids*. J Clin Invest. 1989. 83(4): p. 1267-76.

46. Lacey D., Sampey A., Mitchell R., Bucala R., Santos L., Leech M., y Morand E. *Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor*. Arthritis Rheum. 2003. 48(1): p. 103-9.
47. Zvaifler N.J. *Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther. 2006. 8(3): p. 210.
48. Palao G., Santiago B., Galindo M., Paya M., Ramirez J.C., y Pablos J.L. *Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis*. Arthritis Rheum. 2004. 50(9): p. 2803-10.
49. Franz J.K., Pap T., Hummel K.M., Nawrath M., Aicher W.K., Shigeyama Y., Muller-Ladner U., y col. *Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2000. 43(3): p. 599-607.
50. Drynda A., Quax P.H., Neumann M., Van Der Laan W.H., Pap G., Drynda S., Meinecke I., y col. *Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 reverses the inhibitory effects of TNF-alpha on Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. J Immunol. 2005. 174(10): p. 6524-31.
51. Baier A., Meinecke I., Gay S., y Pap T. *Apoptosis in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol. 2003. 15(3): p. 274-9.
52. Huber L.C., Distler O., Tarner I., Gay R.E., Gay S., y Pap T. *Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford). 2006. 45(6): p. 669-75.
53. Bartok B., y Firestein G.S. *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. Immunol Rev. 2010. 233(1): p. 233-55.
54. Lefevre S., Knedla A., Tennie C., Kampmann A., Wunrau C., Dinser R., Korb A., y col. *Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints*. Nat Med. 2009. 15(12): p. 1414-20.
55. Han Z., Boyle D.L., Shi Y., Green D.R., y Firestein G.S. *Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1999. 42(6): p. 1088-92.
56. Karouzakis E., Gay R.E., Gay S., y Neidhart M. *Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Nat Rev Rheumatol. 2009. 5(5): p. 266-72.
57. Karouzakis E., Gay R.E., Michel B.A., Gay S., y Neidhart M. *DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum. 2009. 60(12): p. 3613-22.
58. Stanczyk J., Pedrioli D.M., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay R.E., Detmar M., y col. *Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2008. 58(4): p. 1001-9.
59. Nakamachi Y., Kawano S., Takenokuchi M., Nishimura K., Sakai Y., Chin T., Saura R., y col. *MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2009. 60(5): p. 1294-304.



60. Rooney M., Condell D., Quinlan W., Daly L., Whelan A., Feighery C., y Bresnihan B. *Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1988. 31(8): p. 956-63.
61. Shiozawa S., Shiozawa K., y Fujita T. *Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus*. Arthritis Rheum. 1983. 26(4): p. 472-8.
62. Croft D., McIntyre P., Wibulswas A., y Kramer I. *Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability*. Am J Pathol. 1999. 154(4): p. 1149-58.
63. Edwards J.C., Leigh R.D., y Cambridge G. *Expression of molecules involved in B lymphocyte survival and differentiation by synovial fibroblasts*. Clin Exp Immunol. 1997. 108(3): p. 407-14.
64. Hamann J., Wishaupt J.O., Van Lier R.A., Smeets T.J., Breedveld F.C., y Tak P.P. *Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue*. Arthritis Rheum. 1999. 42(4): p. 650-8.
65. Morales-Ducet J., Wayner E., Elices M.J., Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., y Firestein G.S. *Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes*. J Immunol. 1992. 149(4): p. 1424-31.
66. Vandooren B., Cantaert T., Ter Borg M., Noordenbos T., Kuhlman R., Gerlag D., Bongartz T., y col. *Tumor necrosis factor alpha drives cadherin 11 expression in rheumatoid inflammation*. Arthritis Rheum. 2008. 58(10): p. 3051-62.
67. Wilkinson L.S., Edwards J.C., Poston R.N., y Haskard D.O. *Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovium*. Lab Invest. 1993. 68(1): p. 82-8.
68. Wilkinson L.S., Pitsillides A.A., Worrall J.G., y Edwards J.C. *Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte)*. Arthritis Rheum. 1992. 35(10): p. 1179-84.
69. Wetzel A., Chavakis T., Preissner K.T., Sticherling M., Hausteiner U.F., Anderegg U., y Saalbach A. *Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Immunol. 2004. 172(6): p. 3850-9.
70. Jurisic G., Iolyeva M., Proulx S.T., Halin C., y Detmar M. *Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium*. Exp Cell Res. 2010.
71. Goodpaster T., Legesse-Miller A., Hameed M.R., Aisner S.C., Randolph-Habecker J., y Collier H.A. *An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue*. J Histochem Cytochem. 2008. 56(4): p. 347-58.
72. Kuroda K., y Tajima S. *HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens*. J Cutan Pathol. 2004. 31(3): p. 241-6.

73. Werb Z., Tremble P.M., Behrendtsen O., Crowley E., y Damsky C.H. *Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression*. J Cell Biol. 1989. 109(2): p. 877-89.
74. Szekanecz Z., Szegedi G., y Koch A.E. *Cellular adhesion molecules in rheumatoid arthritis: regulation by cytokines and possible clinical importance*. J Investig Med. 1996. 44(4): p. 124-35.
75. Carter R.A., O'donnell K., Sachthep S., Cicuttini F., Boyd A.W., y Wicks I.P. *Characterization of a human synovial cell antigen: VCAM-1 and inflammatory arthritis*. Immunol Cell Biol. 2001. 79(5): p. 419-28.
76. Cook-Mills J.M. *VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species*. Mol Immunol. 2002. 39(9): p. 499-508.
77. Yang C.M., Luo S.F., Hsieh H.L., Chi P.L., Lin C.C., Wu C.C., y Hsiao L.D. *Interleukin-1beta induces ICAM-1 expression enhancing leukocyte adhesion in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Involvement of ERK, JNK, AP-1, and NF-kappaB*. J Cell Physiol. 2010.
78. Klimiuk P.A., Sierakowski S., Latosiewicz R., Cylwik J.P., Cylwik B., Skowronski J., y Chwiecko J. *Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis*. Ann Rheum Dis. 2002. 61(9): p. 804-9.
79. Furuzawa-Carballeda J., y Alcocer-Varela J. *Interleukin-8, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis*. Scand J Immunol. 1999. 50(2): p. 215-22.
80. Lee D.M., Kiener H.P., Agarwal S.K., Noss E.H., Watts G.F., Chisaka O., Takeichi M., y col. *Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis*. Science. 2007. 315(5814): p. 1006-10.
81. Hou W.S., Li W., Keyszer G., Weber E., Levy R., Klein M.J., Gravalles E.M., y col. *Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium*. Arthritis Rheum. 2002. 46(3): p. 663-74.
82. Vincenti M.P., y Brinckerhoff C.E. *Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors*. Arthritis Res. 2002. 4(3): p. 157-64.
83. Burrage P.S., Mix K.S., y Brinckerhoff C.E. *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. Front Biosci. 2006. 11: p. 529-43.
84. Pretzel D., Pohlers D., Weinert S., y Kinne R.W. *In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage*. Arthritis Res Ther. 2009. 11(1): p. R25.
85. Kyburz D., Rethage J., Seibl R., Lauener R., Gay R.E., Carson D.A., y Gay S. *Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling*. Arthritis Rheum. 2003. 48(3): p. 642-50.
86. Macnaul K.L., Chartrain N., Lark M., Tocci M.J., y Hutchinson N.I. *Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts*. Synergistic

- effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression.* J Biol Chem. 1990. 265(28): p. 17238-45.
87. Yamanishi Y., Boyle D.L., Clark M., Maki R.A., Tortorella M.D., Arner E.C., y Firestein G.S. *Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta.* J Immunol. 2002. 168(3): p. 1405-12.
  88. Redlich K., Hayer S., Ricci R., David J.P., Tohidast-Akrad M., Kollias G., Steiner G., y col. *Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction.* J Clin Invest. 2002. 110(10): p. 1419-27.
  89. Gravallesse E.M., Manning C., Tsay A., Naito A., Pan C., Amento E., y Goldring S.R. *Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor.* Arthritis Rheum. 2000. 43(2): p. 250-8.
  90. Pettit A.R., Walsh N.C., Manning C., Goldring S.R., y Gravallesse E.M. *RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford). 2006. 45(9): p. 1068-76.
  91. Patel D.D., y Haynes B.F. *Leukocyte homing to synovium.* Curr Dir Autoimmun. 2001. 3: p. 133-67.
  92. Nanki T., Hayashida K., El-Gabalawy H.S., Suson S., Shi K., Girschick H.J., Yavuz S., y col. *Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium.* J Immunol. 2000. 165(11): p. 6590-8.
  93. Tsubaki T., Takegawa S., Hanamoto H., Arita N., Kamogawa J., Yamamoto H., Takubo N., y col. *Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts.* Clin Exp Immunol. 2005. 141(2): p. 363-71.
  94. Schmutz C., Hulme A., Burman A., Salmon M., Ashton B., Buckley C., y Middleton J. *Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: upregulation of CXCR5.* Arthritis Res Ther. 2005. 7(2): p. R217-29.
  95. Patel D.D., Zachariah J.P., y Whichard L.P. *CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium.* Clin Immunol. 2001. 98(1): p. 39-45.
  96. Canete J.D., Santiago B., Cantaert T., Sanmarti R., Palacin A., Celis R., Graell E., y col. *Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis.* Ann Rheum Dis. 2007. 66(6): p. 720-6.
  97. Manzo A., Paoletti S., Carulli M., Blades M.C., Barone F., Yanni G., Fitzgerald O., y col. *Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis.* Eur J Immunol. 2005. 35(5): p. 1347-59.
  98. Szekanecz Z., y Koch A.E. *Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis.* Vascu Pharmacol. 2009. 51(1): p. 1-7.
  99. Szekanecz Z., Szegedi G., y Koch A.E. *Angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic and clinical significance.* J Investig Med. 1998. 46(2): p. 27-41.
  100. Pablos J.L., Santiago B., Galindo M., Torres C., Brehmer M.T., Blanco F.J., y Garcia-Lazaro F.J. *Synoviocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium*

- and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis.* J Immunol. 2003. 170(4): p. 2147-52.
101. Genovese M.C., McKay J.D., Nasonov E.L., Mysler E.F., Da Silva N.A., Alecock E., Woodworth T., y col. *Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study.* Arthritis Rheum. 2008. 58(10): p. 2968-80.
  102. McInnes I.B., Al-Mughales J., Field M., Leung B.P., Huang F.P., Dixon R., Sturrock R.D., y col. *The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis.* Nat Med. 1996. 2(2): p. 175-82.
  103. McInnes I.B., Leung B.P., Sturrock R.D., Field M., y Liew F.Y. *Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis.* Nat Med. 1997. 3(2): p. 189-95.
  104. Harada S., Yamamura M., Okamoto H., Morita Y., Kawashima M., Aita T., y Makino H. *Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 1999. 42(7): p. 1508-16.
  105. Miranda-Carus M.E., Balsa A., Benito-Miguel M., Perez De Ayala C., y Martín-Mola E. *IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate.* J Immunol. 2004. 173(2): p. 1463-76.
  106. Brennan F.M., y McInnes I.B. *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis.* J Clin Invest. 2008. 118(11): p. 3537-45.
  107. Firestein G.S., Boyle D.L., Yu C., Paine M.M., Whisenand T.D., Zvaifler N.J., y Arend W.P. *Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 1994. 37(5): p. 644-52.
  108. Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.* Nat Med. 2000. 6(4): p. 389-95.
  109. Risau W. *Mechanisms of angiogenesis.* Nature. 1997. 386(6626): p. 671-4.
  110. Risau W., y Flamme I. *Vasculogenesis.* Annu Rev Cell Dev Biol. 1995. 11: p. 73-91.
  111. Moses M.A. *The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors.* Stem Cells. 1997. 15(3): p. 180-9.
  112. Mandarino L.J., Sundarraj N., Finlayson J., y Hassell H.R. *Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro.* Exp Eye Res. 1993. 57(5): p. 609-21.
  113. Armulik A., Abramsson A., y Betsholtz C. *Endothelial/pericyte interactions.* Circ Res. 2005. 97(6): p. 512-23.
  114. Rucker H.K., Wynder H.J., y Thomas W.E. *Cellular mechanisms of CNS pericytes.* Brain Res Bull. 2000. 51(5): p. 363-9.
  115. Gerwins P., Skoldenberg E., y Claesson-Welsh L. *Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis.* Crit Rev Oncol Hematol. 2000. 34(3): p. 185-94.

116. Fitzgerald O., Soden M., Yanni G., Robinson R., y Bresnihan B. *Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 1991. 50(11): p. 792-6.
117. Pessler F., Dai L., Diaz-Torne C., Gomez-Vaquero C., Paessler M.E., Zheng D.H., Einhorn E., y col. *The synovitis of "non-inflammatory" orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis*. Ann Rheum Dis. 2008. 67(8): p. 1184-7.
118. Giatromanolaki A., Sivridis E., Athanassou N., Zois E., Thorpe P.E., Brekken R.A., Gatter K.C., y col. *The angiogenic pathway "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor" in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. J Pathol. 2001. 194(1): p. 101-8.
119. Walsh D.A., Wade M., Mapp P.I., y Blake D.R. *Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium*. Am J Pathol. 1998. 152(3): p. 691-702.
120. Koch A.E., Harlow L.A., Haines G.K., Amento E.P., Unemori E.N., Wong W.L., Pope R.M., y col. *Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis*. J Immunol. 1994. 152(8): p. 4149-56.
121. Fava R.A., Olsen N.J., Spencer-Green G., Yeo K.T., Yeo T.K., Berse B., Jackman R.W., y col. *Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue*. J Exp Med. 1994. 180(1): p. 341-6.
122. Shweiki D., Itin A., Soffer D., y Keshet E. *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature. 1992. 359(6398): p. 843-5.
123. Paleolog E.M., Young S., Stark A.C., McCloskey R.V., Feldmann M., y Maini R.N. *Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1998. 41(7): p. 1258-65.
124. Bottomley M.J., Webb N.J., Watson C.J., Holt P.J., Freemont A.J., y Brenchley P.E. *Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid*. Clin Exp Immunol. 1999. 117(1): p. 171-6.
125. Ryu S., Lee J.H., y Kim S.I. *IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes*. Clin Rheumatol. 2006. 25(1): p. 16-20.
126. Cho M.L., Ju J.H., Kim H.R., Oh H.J., Kang C.M., Jhun J.Y., Lee S.Y., y col. *Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts*. Immunol Lett. 2007. 108(2): p. 121-8.
127. Cho C.S., Cho M.L., Min S.Y., Kim W.U., Min D.J., Lee S.S., Park S.H., y col. *CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor*. J Immunol. 2000. 164(10): p. 5055-61.

128. Taylor P.C., y Sivakumar B. *Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol. 2005. 17(3): p. 293-8.
129. Ballara S., Taylor P.C., Reusch P., Marme D., Feldmann M., Maini R.N., y Paleolog E.M. *Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum. 2001. 44(9): p. 2055-64.
130. Taylor P.C. *VEGF and imaging of vessels in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res. 2002. 4 Suppl 3: p. S99-107.
131. Koch A.E. *The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments*. Ann Rheum Dis. 2000. 59 Suppl 1: p. i65-71.
132. Yoo S.A., Kwok S.K., y Kim W.U. *Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention*. Mediators Inflamm. 2008. 2008: p. 129873.
133. Miotla J., Maciewicz R., Kendrew J., Feldmann M., y Paleolog E. *Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis*. Lab Invest. 2000. 80(8): p. 1195-205.
134. Lu J., Kasama T., Kobayashi K., Yoda Y., Shiozawa F., Hanyuda M., Negishi M., y col. *Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis*. J Immunol. 2000. 164(11): p. 5922-7.
135. Afuwape A.O., Feldmann M., y Paleolog E.M. *Adenoviral delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) abrogates disease activity in murine collagen-induced arthritis*. Gene Ther. 2003. 10(23): p. 1950-60.
136. Grunewald M., Avraham I., Dor Y., Bachar-Lustig E., Itin A., Jung S., Chimenti S., y col. *VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells*. Cell. 2006. 124(1): p. 175-89.
137. Zittermann S.I., y Issekutz A.C. *Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation*. J Leukoc Biol. 2006. 80(2): p. 247-57.
138. Murakami M., Iwai S., Hiratsuka S., Yamauchi M., Nakamura K., Iwakura Y., y Shibuya M. *Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages*. Blood. 2006. 108(6): p. 1849-56.
139. Folkman J. *Angiogenesis*. Annu Rev Med. 2006. 57: p. 1-18.
140. Baluk P., Hashizume H., y McDonald D.M. *Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer*. Curr Opin Genet Dev. 2005. 15(1): p. 102-11.
141. Ellis L.M., y Hicklin D.J. *VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity*. Nat Rev Cancer. 2008. 8(8): p. 579-91.
142. Benjamin L.E., Golijanin D., Itin A., Pode D., y Keshet E. *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest. 1999. 103(2): p. 159-65.
143. Hamzah J., Jugold M., Kiessling F., Rigby P., Manzur M., Marti H.H., Rabie T., y col. *Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction*. Nature. 2008. 453(7193): p. 410-4.

144. Greenberg J.I., Shields D.J., Barillas S.G., Acevedo L.M., Murphy E., Huang J., Scheppke L., y col. *A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation*. *Nature*. 2008. 456(7223): p. 809-13.
145. Willett C.G., Boucher Y., Di Tomaso E., Duda D.G., Munn L.L., Tong R.T., Chung D.C., y col. *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer*. *Nat Med*. 2004. 10(2): p. 145-7.
146. Muz B., Khan M.N., Kiriakidis S., y Paleolog E.M. *Hypoxia. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*. 2009. 11(1): p. 201.
147. Distler J.H., Wenger R.H., Gassmann M., Kurowska M., Hirth A., Gay S., y Distler O. *Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. 2004. 50(1): p. 10-23.
148. Nakahara H., Song J., Sugimoto M., Hagihara K., Kishimoto T., Yoshizaki K., y Nishimoto N. *Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. 2003. 48(6): p. 1521-9.
149. Taylor P.C. *Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy*. *Rheumatology (Oxford)*. 2005. 44(6): p. 721-8.
150. Goedkoop A.Y., Kraan M.C., Picavet D.I., De Rie M.A., Teunissen M.B., Bos J.D., y Tak P.P. *Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study*. *Arthritis Res Ther*. 2004. 6(4): p. R326-34.
151. Canete J.D., Pablos J.L., Sanmarti R., Mallofre C., Marsal S., Maymo J., Gratacos J., y col. *Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis*. *Arthritis Rheum*. 2004. 50(5): p. 1636-41.
152. Naredo E., Moller I., Cruz A., Carmona L., y Garrido J. *Power Doppler ultrasonographic monitoring of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. 2008. 58(8): p. 2248-56.
153. Brown A.K., Conaghan P.G., Karim Z., Quinn M.A., Ikeda K., Peterfy C.G., Hensor E., y col. *An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. 2008. 58(10): p. 2958-67.
154. Saleem B., Brown A.K., Keen H., Nizam S., Freeston J., Karim Z., Quinn M., y col. *Disease remission state in patients treated with the combination of tumor necrosis factor blockade and methotrexate or with disease-modifying antirheumatic drugs: A clinical and imaging comparative study*. *Arthritis Rheum*. 2009. 60(7): p. 1915-22.
155. Semenza G.L., y Wang G.L. *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*. 1992. 12(12): p. 5447-54.

156. Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M., y Antonarakis S.E. *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991. 88(13): p. 5680-4.
157. Semenza G.L. *Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999. 15: p. 551-78.
158. Ruas J.L., Poellinger L., y Pereira T. *Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein*. J Biol Chem. 2002. 277(41): p. 38723-30.
159. Jiang B.H., Rue E., Wang G.L., Roe R., y Semenza G.L. *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem. 1996. 271(30): p. 17771-8.
160. Camenisch G., Stroka D.M., Gassmann M., y Wenger R.H. *Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression*. Pflugers Arch. 2001. 443(2): p. 240-9.
161. Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W., Passantino R., Concordet J.P., Maire P., y Giallongo A. *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem. 1996. 271(51): p. 32529-37.
162. Gothie E., Richard D.E., Berra E., Pages G., y Pouyssegur J. *Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Biol Chem. 2000. 275(10): p. 6922-7.
163. Chun Y.S., Choi E., Yeo E.J., Lee J.H., Kim M.S., y Park J.W. *A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses*. J Cell Sci. 2001. 114(Pt 22): p. 4051-61.
164. Chun Y.S., Choi E., Kim T.Y., Kim M.S., y Park J.W. *A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene*. Biochem J. 2002. 362(Pt 1): p. 71-9.
165. Chun Y.S., Lee K.H., Choi E., Bae S.Y., Yeo E.J., Huang L.E., Kim M.S., y col. *Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1alpha isoform: implications for tumor promotion*. Cancer Res. 2003. 63(24): p. 8700-7.
166. Flamme I., Frohlich T., Von Reutern M., Kappel A., Damert A., y Risau W. *HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels*. Mech Dev. 1997. 63(1): p. 51-60.
167. Wiesener M.S., Turley H., Allen W.E., Willam C., Eckardt K.U., Talks K.L., Wood S.M., y col. *Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha*. Blood. 1998. 92(7): p. 2260-8.
168. Rosenberger C., Mandriota S., Jurgensen J.S., Wiesener M.S., Horstrup J.H., Frei U., Ratcliffe P.J., y col. *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys*. J Am Soc Nephrol. 2002. 13(7): p. 1721-32.



169. Wiesener M.S., Jurgensen J.S., Rosenberger C., Scholze C.K., Horstrup J.H., Warnecke C., Mandriota S., y col. *Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs*. FASEB J. 2003. 17(2): p. 271-3.
170. Ivan M., Haberberger T., Gervasi D.C., Michelson K.S., Gunzler V., Kondo K., Yang H., y col. *Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99(21): p. 13459-64.
171. Bruick R.K., y McKnight S.L. *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. Science. 2001. 294(5545): p. 1337-40.
172. Salceda S., y Caro J. *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. J Biol Chem. 1997. 272(36): p. 22642-7.
173. Huang L.E., Gu J., Schau M., y Bunn H.F. *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95(14): p. 7987-92.
174. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., y col. *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature. 1999. 399(6733): p. 271-5.
175. Jewell U.R., Kvietikova I., Scheid A., Bauer C., Wenger R.H., y Gassmann M. *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. FASEB J. 2001. 15(7): p. 1312-4.
176. Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C., y Marti H.H. *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension*. Am J Physiol. 1996. 271(4 Pt 1): p. C1172-80.
177. Arany Z., Huang L.E., Eckner R., Bhattacharya S., Jiang C., Goldberg M.A., Bunn H.F., y col. *An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. 93(23): p. 12969-73.
178. Ebert B.L., y Bunn H.F. *Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein*. Mol Cell Biol. 1998. 18(7): p. 4089-96.
179. Ema M., Hirota K., Mimura J., Abe H., Yodoi J., Sogawa K., Poellinger L., y col. *Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300*. EMBO J. 1999. 18(7): p. 1905-14.
180. Hellwig-Burgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., y Jelkmann W. *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1*. Blood. 1999. 94(5): p. 1561-7.
181. Albina J.E., Mastrofrancesco B., Vessella J.A., Louis C.A., Henry W.L., Jr., y Reichner J.S. *HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in*

- primary inflammatory cells by TNF-alpha*. Am J Physiol Cell Physiol. 2001. 281(6): p. C1971-7.
182. Scharte M., Han X., Bertges D.J., Fink M.P., y Delude R.L. *Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003. 284(3): p. G373-84.
  183. Zhou J., Schmid T., y Brune B. *Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway*. Mol Biol Cell. 2003. 14(6): p. 2216-25.
  184. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., y Semenza G.L. *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. Cancer Res. 1999. 59(16): p. 3915-8.
  185. Shih S.C., y Claffey K.P. *Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression*. Growth Factors. 2001. 19(1): p. 19-34.
  186. Gorlach A., Diebold I., Schini-Kerth V.B., Berchner-Pfannschmidt U., Roth U., Brandes R.P., Kietzmann T., y col. *Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase*. Circ Res. 2001. 89(1): p. 47-54.
  187. Chi J.T., Wang Z., Nuyten D.S., Rodriguez E.H., Schaner M.E., Salim A., Wang Y., y col. *Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers*. PLoS Med. 2006. 3(3): p. e47.
  188. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., y col. *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res. 1999. 59(22): p. 5830-5.
  189. Talks K.L., Turley H., Gatter K.C., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., y Harris A.L. *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages*. Am J Pathol. 2000. 157(2): p. 411-21.
  190. Ravi R., Mookerjee B., Bhujwala Z.M., Sutter C.H., Artemov D., Zeng Q., Dillehay L.E., y col. *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev. 2000. 14(1): p. 34-44.
  191. Zundel W., Schindler C., Haas-Kogan D., Koong A., Kaper F., Chen E., Gottschalk A.R., y col. *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev. 2000. 14(4): p. 391-6.
  192. Iliopoulos O., Levy A.P., Jiang C., Kaelin W.G., Jr., y Goldberg M.A. *Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. 93(20): p. 10595-9.
  193. Falchuk K.H., Goetzl E.J., y Kulka J.P. *Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis*. Am J Med. 1970. 49(2): p. 223-31.

194. Treuhaft P.S., y Dj M.C. *Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases*. Arthritis Rheum. 1971. 14(4): p. 475-84.
195. Naughton D., Whelan M., Smith E.C., Williams R., Blake D.R., y Grootveld M. *An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. FEBS Lett. 1993. 317(1-2): p. 135-8.
196. Giatromanolaki A., Sivridis E., Maltezos E., Athanassou N., Papazoglou D., Gatter K.C., Harris A.L., y col. *Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Arthritis Res Ther. 2003. 5(4): p. R193-201.
197. Haddad J.J., y Land S.C. *A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha*. FEBS Lett. 2001. 505(2): p. 269-74.
198. Richard D.E., Berra E., y Pouyssegur J. *Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem. 2000. 275(35): p. 26765-71.
199. Thornton R.D., Lane P., Borghaei R.C., Pease E.A., Caro J., y Mochan E. *Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts*. Biochem J. 2000. 350 Pt 1: p. 307-12.
200. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E., Forster I., Pawlinski R., Mackman N., Haase V.H., y col. *HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation*. Cell. 2003. 112(5): p. 645-57.
201. Hitchon C., Wong K., Ma G., Reed J., Lyttle D., y El-Gabalawy H. *Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum. 2002. 46(10): p. 2587-97.
202. Charbonneau M., Harper K., Grondin F., Pelmus M., McDonald P.P., y Dubois C.M. *Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor alpha-induced increases in tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells*. J Biol Chem. 2007. 282(46): p. 33714-24.
203. Ahn J.K., Koh E.M., Cha H.S., Lee Y.S., Kim J., Bae E.K., y Ahn K.S. *Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes*. Rheumatology (Oxford). 2008. 47(6): p. 834-9.
204. Du R., Lu K.V., Petritsch C., Liu P., Ganss R., Passegue E., Song H., y col. *HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion*. Cancer Cell. 2008. 13(3): p. 206-20.
205. Hattori K., Dias S., Heissig B., Hackett N.R., Lyden D., Tateno M., Hicklin D.J., y col. *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. J Exp Med. 2001. 193(9): p. 1005-14.
206. Petit I., Jin D., y Rafii S. *The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis*. Trends Immunol. 2007. 28(7): p. 299-307.

207. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., Mcshane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healey L.A., y col. *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1988. 31(3): p. 315-24.
208. Vacca L.L., *Laboratory Manual of Histochemistry*. 1985, New York: Raven Press.
209. Razorenova O.V., Ivanov A.V., Budanov A.V., y Chumakov P.M. *Virus-based reporter systems for monitoring transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1*. Gene. 2005. 350(1): p. 89-98.
210. Smith M.D., Barg E., Weedon H., Papangelis V., Smeets T., Tak P.P., Kraan M., y col. *Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints*. Ann Rheum Dis. 2003. 62(4): p. 303-7.
211. Haringman J.J., Gerlag D.M., Zwinderman A.H., Smeets T.J., Kraan M.C., Baeten D., Mcinnes I.B., y col. *Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 2005. 64(6): p. 834-8.
212. Fransen J., y Van Riel P.L. *The Disease Activity Score and the EULAR response criteria*. Clin Exp Rheumatol. 2005. 23(5 Suppl 39): p. S93-9.
213. Baluk P., y Mcdonald D.M. *Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis*. Ann N Y Acad Sci. 2008. 1131: p. 1-12.
214. Canete J.D., Celis R., Moll C., Izquierdo E., Marsal S., Sanmarti R., Palacin A., y col. *Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 2009. 68(5): p. 751-6.
215. Karhausen J., Kong T., Narravula S., y Colgan S.P. *Induction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits HIF-1 expression*. J Cell Biochem. 2005. 95(6): p. 1264-75.
216. Liang W.C., Wu X., Peale F.V., Lee C.V., Meng Y.G., Gutierrez J., Fu L., y col. *Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF*. J Biol Chem. 2006. 281(2): p. 951-61.
217. Semenza G.L. *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer. 2003. 3(10): p. 721-32.
218. Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J., Tepper O.M., Bastidas N., Kleinman M.E., Capla J.M., y col. *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med. 2004. 10(8): p. 858-64.
219. Li X., y Makarov S.S. *An essential role of NF-kappaB in the "tumor-like" phenotype of arthritic synoviocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 103(46): p. 17432-7.
220. Muller-Ladner U., Kriegsmann J., Franklin B.N., Matsumoto S., Geiler T., Gay R.E., y Gay S. *Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice*. Am J Pathol. 1996. 149(5): p. 1607-15.

221. Del Rey M.J., Izquierdo E., Caja S., Usategui A., Santiago B., Galindo M., y Pablos J.L. *Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice.* Arthritis Rheum. 2009. 60(10): p. 2926-34.
222. Athanasou N.A., Quinn J., Heryet A., Puddle B., Woods C.G., y Mcgee J.O. *The immunohistology of synovial lining cells in normal and inflamed synovium.* J Pathol. 1988. 155(2): p. 133-42.
223. Kruithof E., De Rycke L., Roth J., Mielants H., Van Den Bosch F., De Keyser F., Veys E.M., y col. *Immunomodulatory effects of etanercept on peripheral joint synovitis in the spondylarthropathies.* Arthritis Rheum. 2005. 52(12): p. 3898-909.
224. Smith M.D., Kraan M.C., Slavotinek J., Au V., Weedon H., Parker A., Coleman M., y col. *Treatment-induced remission in rheumatoid arthritis patients is characterized by a reduction in macrophage content of synovial biopsies.* Rheumatology (Oxford). 2001. 40(4): p. 367-74.
225. Smeets T.J., Kraan M.C., Van Loon M.E., y Tak P.P. *Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue.* Arthritis Rheum. 2003. 48(8): p. 2155-62.
226. Burger J.A., Zvaifler N.J., Tsukada N., Firestein G.S., y Kipps T.J. *Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism.* J Clin Invest. 2001. 107(3): p. 305-15.
227. Bradfield P.F., Amft N., Vernon-Wilson E., Exley A.E., Parsonage G., Rainger G.E., Nash G.B., y col. *Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue.* Arthritis Rheum. 2003. 48(9): p. 2472-82.
228. Armaka M., Apostolaki M., Jacques P., Kontoyiannis D.L., Elewaut D., y Kollias G. *Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases.* J Exp Med. 2008. 205(2): p. 331-7.
229. Marinova-Mutafchieva L., Williams R.O., Funa K., Maini R.N., y Zvaifler N.J. *Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis.* Arthritis Rheum. 2002. 46(2): p. 507-13.
230. Smolen J.S., Han C., Bala M., Maini R.N., Kalden J.R., Van Der Heijde D., Breedveld F.C., y col. *Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study.* Arthritis Rheum. 2005. 52(4): p. 1020-30.
231. Firestein G.S., Kelley, W. N., Budd, R. C, Harris, E. D., Mcinnes, I. B, Ruddy, S. Y, Sargent, J. S., *Kelley's textbook of rheumatology.* 2009, Philadelphia: Saunders/Elsevier.

232. Hellstrom M., Kalen M., Lindahl P., Abramsson A., y Betsholtz C. *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. Development. 1999. 126(14): p. 3047-55.
233. Nagashima M., Yoshino S., Ishiwata T., y Asano G. *Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol. 1995. 22(9): p. 1624-30.
234. Szekanecz Z., y Koch A.E. *Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases*. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007. 3(11): p. 635-43.
235. Kennedy A., Ng C.T., Biniecka M., Saber T., Taylor C., O'sullivan J., Veale D.J., y col. *Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum. 2010. 62(3): p. 711-21.
236. Kanbe K., Inoue K., Inoue Y., y Suzuki Y. *Histological analysis of synovium in cases of effect attenuation associated with infliximab therapy in rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol. 2008. 27(6): p. 777-81.
237. Baluk P., Yao L.C., Feng J., Romano T., Jung S.S., Schreiter J.L., Yan L., y col. *TNF-alpha drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice*. J Clin Invest. 2009.
238. Jain R.K., Tong R.T., y Munn L.L. *Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model*. Cancer Res. 2007. 67(6): p. 2729-35.
239. Okazaki T., Ni A., Baluk P., Ayeni O.A., Kearley J., Coyle A.J., Humbles A., y col. *Capillary defects and exaggerated inflammatory response in the airways of EphA2-deficient mice*. Am J Pathol. 2009. 174(6): p. 2388-99.
240. Tolboom T.C., Pieterman E., Van Der Laan W.H., Toes R.E., Huidekoper A.L., Nelissen R.G., Breedveld F.C., y col. *Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10*. Ann Rheum Dis. 2002. 61(11): p. 975-80.
241. Pierer M., Rethage J., Seibl R., Lauener R., Brentano F., Wagner U., Hantzel H., y col. *Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands*. J Immunol. 2004. 172(2): p. 1256-65.
242. Ahn G.O., y Brown J.M. *Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells*. Cancer Cell. 2008. 13(3): p. 193-205.
243. Seandel M., Butler J., Lyden D., y Rafii S. *A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization*. Cancer Cell. 2008. 13(3): p. 181-3.
244. Juarranz M.G., Santiago B., Torroba M., Gutierrez-Canas I., Palao G., Galindo M., Abad C., y col. *Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells*. Rheumatology (Oxford). 2004. 43(4): p. 416-22.
245. Feldmann M., y Maini R.N. *Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?* Annu Rev Immunol. 2001. 19: p. 163-96.

246. Haywood L., McWilliams D.F., Pearson C.I., Gill S.E., Ganesan A., Wilson D., y Walsh D.A. *Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis*. Arthritis Rheum. 2003. 48(8): p. 2173-7.
247. Santiago B., Calonge E., Rey M.J., Gutierrez-Canas I., Izquierdo E., Usategui A., Galindo M., y col. *CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts*. Cytokine. 2010.
248. Santiago B., Baleux F., Palao G., Gutierrez-Canas I., Ramirez J.C., Arenzana-Seisdedos F., y Pablos J.L. *CXCL12 is displayed by rheumatoid endothelial cells through its basic amino-terminal motif on heparan sulfate proteoglycans*. Arthritis Res Ther. 2006. 8(2): p. R43.
249. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., y Semenza G.L. *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol. 1996. 16(9): p. 4604-13.
250. Melillo G. *Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy*. Mol Cancer Res. 2006. 4(9): p. 601-5.
251. Kung A.L., Zabudoff S.D., France D.S., Freedman S.J., Tanner E.A., Vieira A., Cornell-Kennon S., y col. *Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway*. Cancer Cell. 2004. 6(1): p. 33-43.
252. Scheinecker C., Redlich K., y Smolen J.S. *Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations*. Immunity. 2008. 28(4): p. 440-4.
253. Thurlings R.M., Vos K., Wijbrandts C.A., Zwinderman A.H., Gerlag D.M., y Tak P.P. *Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response*. Ann Rheum Dis. 2008. 67(7): p. 917-25.





**VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS  
DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL**

---



# Human Inflammatory Synovial Fibroblasts Induce Enhanced Myeloid Cell Recruitment and Angiogenesis Through a Hypoxia-Inducible Transcription Factor 1 $\alpha$ /Vascular Endothelial Growth Factor–Mediated Pathway in Immunodeficient Mice

Manuel J. del Rey, Elena Izquierdo, Sergio Caja, Alicia Usategui, Begoña Santiago, María Galindo, and José L. Pablos

**Objective.** Hyperplasia and phenotypic changes in fibroblasts are often observed in chronic inflammatory lesions, and yet the autonomous pathogenic contribution of these changes is uncertain. The purpose of this study was to analyze the intrinsic ability of fibroblasts from chronically inflamed synovial tissue to drive cell recruitment and angiogenesis.

**Methods.** Fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA), as well as fibroblasts from healthy synovial tissue and healthy skin, were cultured and subcutaneously engrafted into immunodeficient mice. Cell infiltration and angiogenesis were analyzed in the grafts by immunohistochemical studies. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL12, and hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in these processes was investigated using specific antagonists or small interfering RNA (siRNA)–mediated down-regulation of HIF-1 $\alpha$  in fibroblasts.

**Results.** Inflammatory (OA and RA) synovial

fibroblasts, compared with healthy dermal or synovial tissue fibroblasts, induced a significant enhancement in myeloid cell infiltration and angiogenesis in immunodeficient mice. These activities were associated with increased constitutive and hypoxia-induced expression of VEGF, but not CXCL12, in inflammatory fibroblasts compared with healthy fibroblasts. VEGF and CXCL12 antagonists significantly reduced myeloid cell infiltration and angiogenesis. Furthermore, targeting of HIF-1 $\alpha$  expression by siRNA or of HIF-1 $\alpha$  transcriptional activity by the small molecule chetomin in RA fibroblasts significantly reduced both responses.

**Conclusion.** These results demonstrate that chronic synovial inflammation is associated with stable fibroblast changes that, under hypoxic conditions, are sufficient to induce inflammatory cell recruitment and angiogenesis, both of which are processes relevant to the perpetuation of chronic inflammation.

Fibroblasts are ubiquitous mesenchymal cells with vital functions during development and adulthood. They synthesize the extracellular matrix components of connective tissues needed for homeostasis and reparative responses. During development, interactions between mesenchymal and other cell lineages are necessary for the formation of many organs, and fibroblasts are sufficient to provide the positional cues required for the induction and development of the different tissues (1,2). In the adult, multiple evidence points to specialized fibroblasts as a major force in the regulation of cell homing, migration, and differentiation of highly dynamic cell populations, such as cells of the immune system or the bone marrow (3,4). With regard to the pathologic

Supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (grant FIS 05/060). Dr. del Rey's work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria post-Formación Sanitaria Especializada training program. Ms Izquierdo's work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria predoctoral training program.

Manuel J. del Rey, PhD, Elena Izquierdo, MSc, Sergio Caja, PhD, Alicia Usategui, MSc, Begoña Santiago, PhD, María Galindo, MD, PhD, José L. Pablos, MD, PhD: Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Dr. del Rey and Ms Izquierdo contributed equally to this work.

Address correspondence and reprint requests to José L. Pablos, MD, PhD, Unidad de Investigación, Avenida Andalucía s/n, Hospital 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain. E-mail: jlpablos@h12o.es.

Submitted for publication March 12, 2009; accepted in revised form June 23, 2009.

functions of fibroblasts, besides their contribution to tissue damage or repair, fibroblasts seem to play critical roles in orchestrating the homing, growth, or function of other cell types, such as inflammatory or cancer cells (5–8).

The contribution of a pathologic fibroblast phenotype to the development of tumors is widely recognized (7–9). Tumor stroma has the capacity to induce the recruitment of bone marrow–derived myeloid cells that, in concert with cancer fibroblasts, induce a strong angiogenic response fostering tumor growth (8,10). Hypoxia plays a relevant role in this process through the activation of hypoxia-inducible transcription factor (HIF), consistent with the role of HIF as a tumor-progression factor (11–13). Two important HIF-responsive fibroblast factors are vascular endothelial growth factor (VEGF) and the chemokine CXCL12, both of which can synergize in the recruitment and retention of myeloid cells, a critical cell element in the angiogenic response of tumor stroma (11,14).

An important contribution of the hyperplasia of fibroblasts to chronic inflammation and tissue destruction has also been proposed, particularly in patients with rheumatoid arthritis (RA), in whom there is sufficient evidence to indicate an association between abnormal fibroblast phenotype and chronic inflammation (15). The crosstalk between fibroblasts and infiltrating leukocytes seems necessary for arthritis development, such that specific targeting of synovial fibroblasts is sufficient to reduce the inflammatory process (16). Furthermore, tumor necrosis factor receptor I expression by stromal cells is necessary and sufficient to drive arthritis in experimental models (17). Macrophage infiltration and angiogenesis are critical processes in the pathogenesis of chronic arthritis, and their indirect down-regulation by different therapies has been demonstrated as an early and reliable marker of clinical response (18–22). Inflammatory stroma in chronic RA mirrors several features of cancer stroma, including a severely reduced oxygen concentration, enhanced macrophage infiltration and angiogenesis, and a pseudotumoral growth and invasion of neighboring tissues (23–26). Therefore, we have hypothesized that chronic inflammatory and tumor environments could similarly favor myeloid cell recruitment and angiogenesis through phenotypic changes in stromal fibroblasts (27).

On the basis of this hypothesis, we used engraftment of fibroblasts obtained from patients with chronic arthritis into immunodeficient mice. Our results demonstrated that inflammatory fibroblasts display an enhanced ability to induce the recruitment of myeloid cells

and angiogenesis, and these changes were correlated with increased VEGF expression. The process could be blocked at different levels, including via the inhibition of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF axis and the chemokine CXCL12.

## MATERIALS AND METHODS

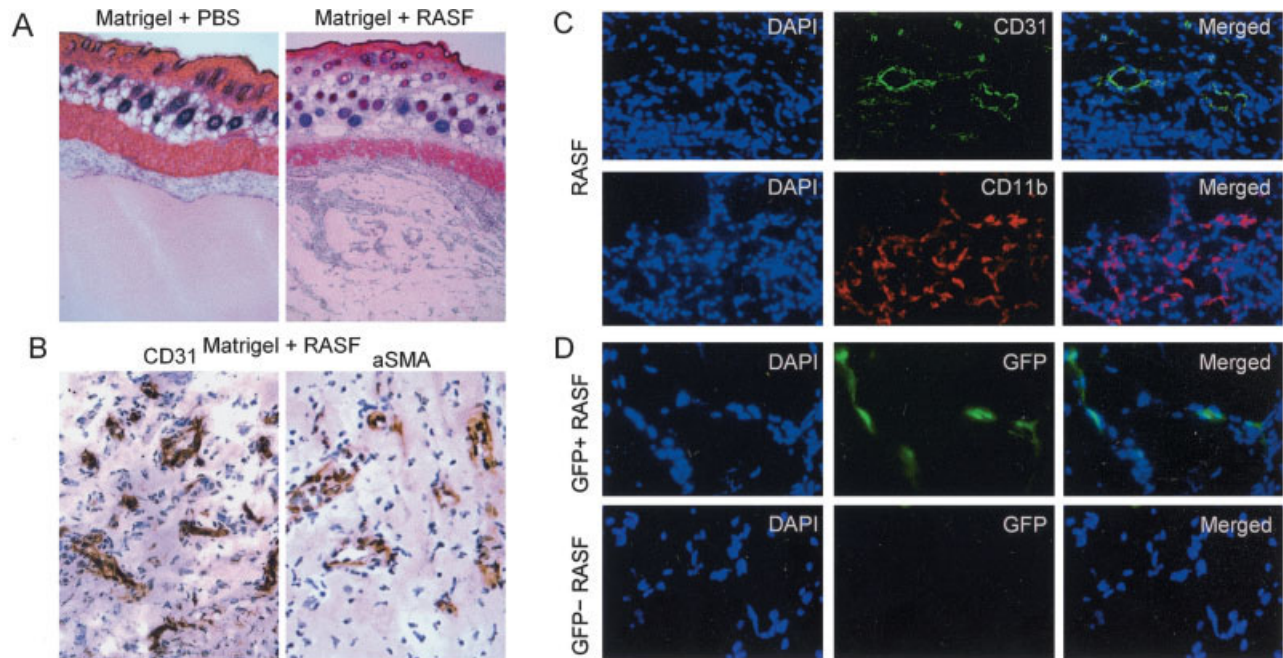
**Human cells and tissues.** Synovial tissue samples were obtained from 11 patients with RA and 9 patients with osteoarthritis (OA) at the time of knee prosthetic replacement surgery, and from 7 adult donors without a history of joint disease, from whom macroscopically healthy joints were obtained at necropsy or at elective knee arthroscopic surgery for meniscal tears. Healthy skin was obtained from 4 individuals during cosmetic surgery procedures. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre, and the tissue samples were obtained after the subjects had provided their informed consent. Fibroblast cultures were established by explant growth in 10% fetal calf serum/Dulbecco's modified Eagle's medium and used between passages 3 and 9. Hypoxic cultures (exposed to an atmosphere of 0.5% O<sub>2</sub>) were obtained in a cell incubator under controlled anaerobic (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) conditions.

**Fibroblast implants in immunodeficient mice.** Fibroblast implants were prepared by suspension of  $0.5 \times 10^6$  fibroblasts in 500  $\mu$ l of Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA). Matrigel was injected subcutaneously into the back skin of Athymic Nude-*Foxn1*<sup>nu</sup> mice (Harlan-Ibérica, Barcelona, Spain). After 7 days, the skin containing the Matrigel plugs was excised and snap-frozen. Frozen sections were fixed in 4% paraformaldehyde and examined by hematoxylin and eosin staining or used for immunolabeling studies.

Matrigel sections were analyzed by immunofluorescence or immunoperoxidase labeling with an anti-CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (anti- $\alpha$ -SMA) antibody (clone 1A4; Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain), or phycoerythrin-labeled anti-CD11b antibody (clone M1/70; BD PharMingen, San Jose, CA). Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole or hematoxylin. Secondary antibodies, either biotinylated (Vector Laboratories, Burlingame, CA) or labeled with Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, OR), were used. Quantitative data were obtained by counting the number of CD31-positive blood vessels or the total number of positively staining cells per area in digitalized images covering the whole Matrigel area, using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Mice were treated by intraperitoneal (IP) administration of the specific CXCL12/CXCR4 receptor antagonist bicyclam AMD3100 (Sigma-Aldrich Química) or the anti-human VEGF monoclonal antibody (mAb) bevacizumab (Roche Farma S.A., Madrid, Spain). The HIF-1 $\alpha$  transcriptional antagonist chetomin (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) was incorporated into the Matrigel matrix prior to the suspension of fibroblasts.

**Transduction of fibroblasts with lentiviral–green fluorescent protein (GFP) and lentiviral–small interfering RNA (siRNA).** To track the fibroblasts implanted into the excised Matrigel plug sections, fibroblasts were first transduced with



**Figure 1.** Analysis of the capability of human inflammatory fibroblasts to induce myeloid cell infiltration and angiogenesis. Human synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis (RASFs) were subcutaneously implanted into Matrigel plugs and then injected into the back skin of immunodeficient mice. **A**, Myeloid cell infiltrates and vessel-like structures in RASF and acellular (control) Matrigel implants were assessed by hematoxylin and eosin staining. Phosphate buffered saline (PBS) was used as the control. **B**, Vascular structures in the RASF implants were identified by immunoperoxidase staining for endothelial cells (ECs) (with CD31) or pericytes (with anti- $\alpha$ -smooth muscle actin [ $\alpha$ SMA]). **C**, Immunofluorescence labeling of perivascular mononuclear cell infiltrates was done using mouse myeloid CD11b (myeloid cell marker), CD31 (EC marker), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) counterstaining. **D**, Localization of RASFs in Matrigel implants was tracked using green fluorescent protein (GFP) transduction of fibroblasts. (Original magnification  $\times 100$  in **A**;  $\times 400$  in **B–D**.)

GFP-expressing lentiviral particles, obtained by cotransfection of 293T cells with pRRL.eGFP transfer vector, pMDLgag/pol-RRE, pRSV-Rev packaging vectors, and pMD2-VSVg envelope vector (28). Supernatants were harvested 48 hours after transfection, filtrated through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  filter, and directly used for fibroblast transduction. GFP expression was directly examined by fluorescence microscopy of fibroblast cultures before incorporation of the fibroblasts into the Matrigel implants.

HIF-1 $\alpha$ -targeting siRNA, as previously described (29), and a control siRNA containing the same scrambled sequence were cloned on a pRNAT lentiviral transfer vector (GenScript, Piscataway, NJ). The efficiency of HIF-1 $\alpha$  targeting was checked by Western blotting with specific HIF-1 $\alpha$  antibodies (BD PharMingen) and by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for VEGF messenger RNA (mRNA) expression in fibroblasts exposed to an atmosphere of 0.5% O<sub>2</sub> or treated with 300  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub>.

**Real-time quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted, and 1  $\mu\text{g}$  was used for first-strand complementary DNA synthesis. Quantitative PCR analysis was performed on a Roche LightCycler instrument using SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The following sequences of primers were used: for CXCL12, sense

5'-TCTGAGAGCTCGCTTGAGTG-3' and antisense 5'-GTGGATCGCATCTATGCATG-3'; for VEGF, sense 5'-GGTG-AAGTTCATGGATGTCT-3' and antisense 5'-GCTGTAG-GAAGCTCATCTCT-3'; and for  $\beta$ -actin, sense 5'-CTACCT-CATGAAGATCCTCAC-3' and antisense 5'-GTCCACGT-CACACTTCATGATG-3'. For relative quantification, we compared the amount of target mRNA normalized to that of the endogenous reference, using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formula, where  $C_t$  is the mean of the threshold cycle at which the amplification of the PCR product is initially detected.

**Statistical analysis.** Data were analyzed using Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). Either Student's *t*-test or the Mann-Whitney test was used, as appropriate, to determine statistically significant differences in the quantitative PCR or histologic data. In all analyses, *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

**Induction of enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis by inflammatory fibroblasts in immunodeficient mice.** To examine the intrinsic ability of human inflammatory fibroblasts to induce cell recruit-

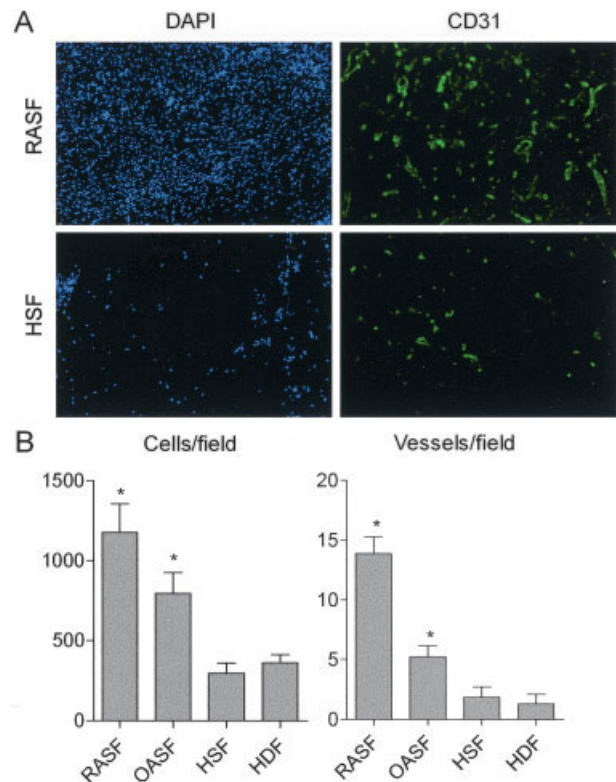


ment and homing *in vivo*, we implanted Matrigel plugs containing synovial fibroblasts derived from human inflammatory (OA and RA) synovial tissue by subcutaneous injection into immunodeficient mice. After 7 days, the implants containing inflammatory fibroblasts showed a dense cellular infiltrate composed of vessel-like structures, some of which displayed a central lumen (Figure 1A). In contrast, control Matrigel implants, which lacked fibroblasts, remained acellular, and no vascular structures could be identified (Figure 1A). These structures in the inflammatory fibroblast-derived implants were identified as mature blood vessels composed of CD31-positive endothelial cells and perivascular anti- $\alpha$ -SMA-positive pericytes, and were surrounded by a strong perivascular mononuclear cell infiltrate showing positivity for the mouse CD11b myeloid cell marker (Figures 1B and C).

Engraftment of implanted fibroblasts was tracked by transduction of fibroblasts with lentiviral-GFP prior to engraftment. GFP expression was detectable in >90% of the transduced fibroblasts in tissue culture. GFP-positive fibroblasts were identified in the Matrigel implants, wherein they represented a low proportion of the cells. GFP-positive fibroblasts had a scattered distribution without a blood vessel disposition (Figure 1D) and did not show colocalization with CD31 immunolabeling, thus discarding the possibility of differentiation of implanted cells into endothelial cells (results not shown).

The extent of cell infiltration and that of angiogenesis were variable in the Matrigel implants containing the different fibroblast lines but were more reproducible in different implants of the same line in the different mice. The maximal responses were induced by RA fibroblasts, but OA fibroblasts also induced a significantly increased response compared with fibroblasts obtained from noninflammatory tissues (healthy skin or synovial tissue), as shown in Figures 2A and B.

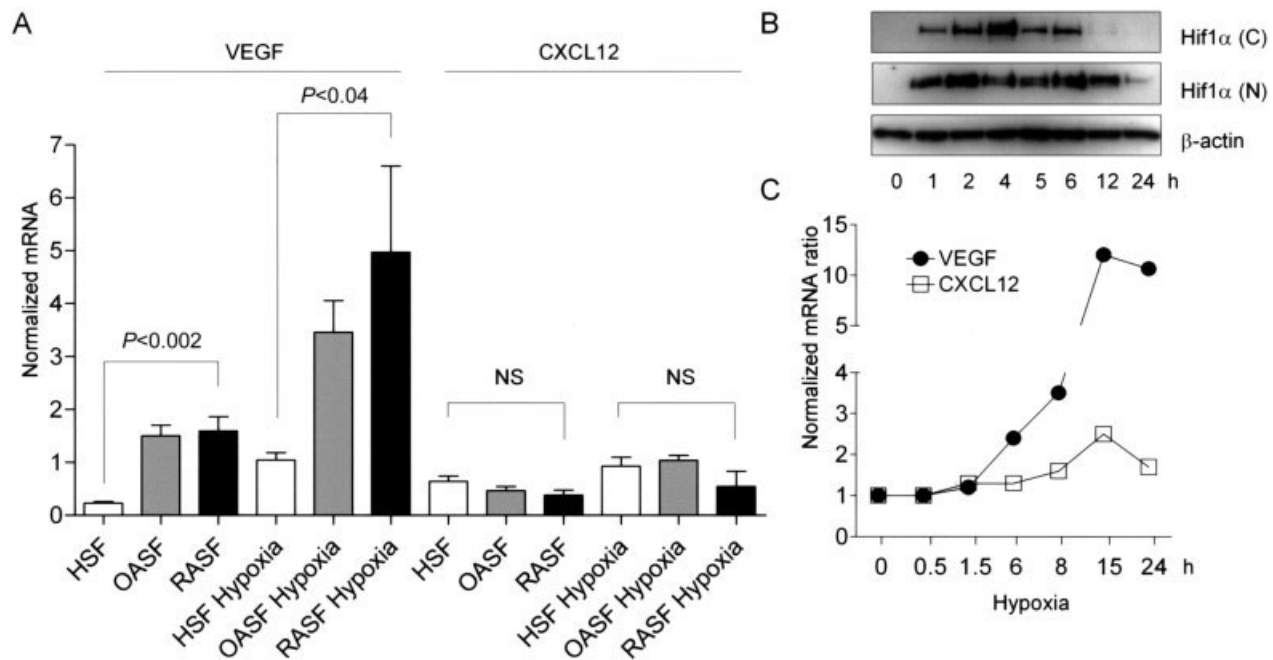
**Increased constitutive and hypoxia-induced expression of VEGF, but not CXCL12, in inflammatory synovial fibroblasts.** Previous studies have identified VEGF and CXCL12 as 2 fibroblast-derived factors critical to myeloid cell recruitment and angiogenesis in other settings (11,14). To analyze whether differences in the expression of CXCL12 or VEGF account for the observed differences between healthy and inflammatory fibroblasts, we quantified VEGF and CXCL12 mRNA expression in the different groups of fibroblasts. Significantly higher constitutive VEGF mRNA expression was observed in inflammatory RA and OA fibroblasts compared with healthy fibroblasts, whereas similar levels of constitutive CXCL12 mRNA expression were observed



**Figure 2.** Extent of induction of cell infiltration and angiogenesis by inflammatory fibroblasts. Matrigel implants containing inflammatory synovial fibroblasts from 11 patients with rheumatoid arthritis (RASFs) or from 9 patients with osteoarthritis (OASFs), or implants containing healthy synovial fibroblasts (HSFs) from 7 subjects or healthy dermal fibroblasts (HDFs) from 4 subjects, were analyzed for the extent of cell infiltration and angiogenic capacity. **A**, Representative results of CD31 immunolabeling of endothelial cell infiltration in RASF or HSF Matrigel implants are shown (counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]; original magnification  $\times 100$ ). **B**, The numbers of cells with DAPI-positive nuclei (left) and CD31-positive vessels per high-power field (right) were counted on digitalized images using ImageJ software. Bars show the mean and SEM. \* =  $P < 0.05$  versus HSFs.

in all groups (Figure 3A). No significant differences in VEGF or CXCL12 mRNA levels were observed between OA and RA synovial fibroblasts (Figure 3A). We therefore used RA synovial fibroblasts in further studies.

Since avascular Matrigel implants represent a critically hypoxic environment similar to that in inflammatory tissue (22–24), we analyzed VEGF expression in response to hypoxia in the different groups of fibroblasts. In fibroblasts incubated under an atmosphere of 0.5%  $O_2$ , transient cytoplasmic and nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$  was observed (Figure 3B), similar to that reported in other cell types (30). HIF-1 $\alpha$  accumulation



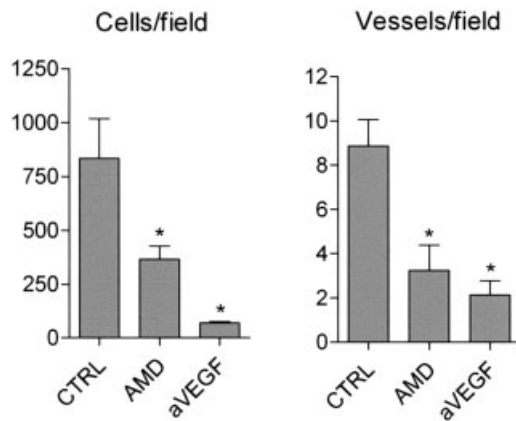
**Figure 3.** Constitutive and hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXCL12, and activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in inflammatory fibroblasts. **A**, Synovial fibroblasts from 11 patients with rheumatoid arthritis (RASFs), 9 patients with osteoarthritis (OASFs), and 7 healthy subjects (HSFs) were cultured under normoxic or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>) conditions. The different groups of fibroblasts were analyzed by quantitative polymerase chain reaction for the expression of VEGF and CXCL12 mRNA under conditions of normoxia or after 15 hours of hypoxia, with results normalized to the values for  $\beta$ -actin. Bars show the mean and SEM. NS = *P* not significant. **B**, HIF-1 $\alpha$  cytoplasmic (C) or nuclear (N) accumulation was analyzed by Western blotting in an RASF line after varying lengths of time under hypoxic conditions. **C**, The hypoxia: normoxia ratios of VEGF mRNA expression and CXCL12 mRNA expression after varying lengths of time under hypoxia were analyzed; representative results from a single RASF line are shown.

was closely followed by a strong induction of VEGF mRNA expression (Figure 3C). Although the magnitude of the response to hypoxia was similar in inflammatory (RA and OA) synovial fibroblasts and healthy synovial fibroblasts, the absolute expression of VEGF was also significantly higher under hypoxic conditions in both RA and OA synovial fibroblasts compared with healthy synovial fibroblasts (Figure 3A). A slightly lower level of VEGF mRNA was detected in hypoxic OA fibroblasts compared with hypoxic RA fibroblasts, but the difference was not statistically significant (Figure 3A). Expression of CXCL12 mRNA showed a detectable, but weaker, induction by hypoxia (Figure 3C), but the absolute expression levels of CXCL12 were similar in all groups of synovial fibroblasts (Figure 3A).

Enhanced angiogenesis has been shown to correlate with increased CXCL12 expression and myofibroblast differentiation in some tumors (8). Although a low proportion of myofibroblasts (anti- $\alpha$ -SMA-positive cells) could be demonstrated by immunofluorescence labeling in some fibroblast cultures, we failed to detect a

correlation between the distribution of anti- $\alpha$ -SMA-positive cells and CXCL12 expression (results not shown), nor did we detect a correlation between CXCL12 expression and the angiogenic capacity of the different fibroblast groups, as shown in Figures 2 and 3.

**Inhibition of inflammatory fibroblast-induced cell infiltration and angiogenesis by VEGF or CXCL12 antagonists.** To confirm the roles of VEGF and CXCL12 derived from inflammatory synovial fibroblasts in myeloid cell recruitment and angiogenesis, we analyzed the effect of their specific antagonists in vivo. The specific anti-human VEGF mAb bevacizumab was used to neutralize the expression of fibroblast-derived VEGF, since, at the selected dose, it has been shown to neutralize expression of human, but not mouse, VEGF in human tumor xenografts in mice (31). A strong inhibitory effect was achieved by a single IP injection of bevacizumab at a dose of 5 mg/kg at the time of Matrigel injection. The inhibitory effect included a significant reduction in cell infiltration as well as a decrease in the number of new vessels in the Matrigel implants (Figure 4).

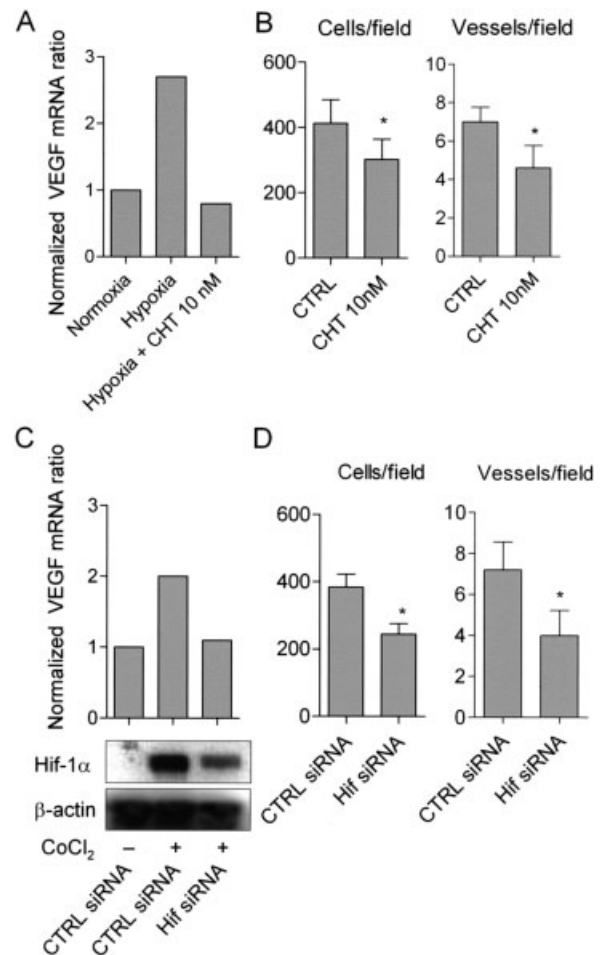


**Figure 4.** Decrease in cell infiltration and angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXCL12 antagonists. Mice with rheumatoid arthritis synovial fibroblast (RASf) Matrigel implants were treated intraperitoneally (IP) with the VEGF monoclonal antibody bevacizumab (aVEGF) at a dose of 5 mg/kg or with daily IP dose injections of 300  $\mu$ g of the CXCL12 antagonist AMD3100. The numbers of cells with 4',6-diamidino-2-phenylindole-positive nuclei and CD31-positive vessels per high-power field were counted on digitalized images using ImageJ software. Bars show the mean and SEM representative results from 1 of 3 independent experiments using 2 different RASf lines, in at least 5 mice per group. \* =  $P < 0.05$  versus untreated control (CTRL).

Similarly, in mice treated with the CXCR4 receptor antagonist bicyclam AMD3100 by daily IP injection of 300  $\mu$ g, a significant reduction in both cell infiltration and angiogenesis was observed (Figure 4). Therefore, either the VEGF or CXCL12/CXCR4 antagonist was sufficient to reduce myeloid cell infiltration and angiogenesis, supporting the relevance and complementary roles of both fibroblast factors in this process.

**Inhibition of inflammatory fibroblast-induced cell infiltration and angiogenesis by the HIF transcriptional antagonist and by HIF-targeting siRNA.** Since both fibroblast-derived factors, VEGF and CXCL12, seemed to contribute to cell infiltration and angiogenesis and both are inducible by hypoxia (12,13,25), we investigated the effect of either targeting the HIF-dependent transcriptional response with the use of the small molecule chetomin or blocking the expression of HIF-1 $\alpha$  by transduction of fibroblasts with specific lentiviral-siRNA (29,32).

Treatment of RA fibroblast cultures with the HIF transcriptional antagonist chetomin induced significant cytotoxicity at concentrations of  $\geq 50$  nM (results not shown), although these higher concentrations have been previously reported to be noncytotoxic in other cell types (32). At the noncytotoxic concentration of 10 nM, chet-



**Figure 5.** Inhibition of hypoxic vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and of cell infiltration and angiogenesis by chetomin (CHT) or by small interfering RNA (siRNA) targeting of hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in rheumatoid arthritis synovial fibroblast (RASf) cultures. **A** and **B**, RASf cultures were treated with 10 nM chetomin or vehicle control (CTRL) and then cultured under conditions of normoxia or hypoxia (0.5% O<sub>2</sub>). **A**, The ratio of VEGF mRNA expression under hypoxia to that under normoxia was analyzed by quantitative polymerase chain reaction (PCR) before and after treatment with chetomin. Representative results from a single RASf line are shown. **B**, Cell infiltration and vessel density were evaluated in the RASf Matrigel implants treated with vehicle control or 10 nM chetomin. **C** and **D**, RASfs were transduced with control siRNA or HIF-1 $\alpha$  siRNA and kept in cultures treated with 300  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>. **C**, HIF-1 $\alpha$  protein expression was analyzed by Western blotting (bottom), and the ratio of VEGF mRNA expression in HIF-1 $\alpha$  siRNA-transduced to control siRNA-transduced RASfs was analyzed by quantitative PCR (top). Representative results from a single RASf line are shown. **D**, Cell infiltration and vessel density were evaluated in the Matrigel implants containing RASfs transduced with control or HIF-1 $\alpha$  siRNA. Bars in **B** and **D** show the mean and SEM results in at least 5 mice per group. Results in **A–D** are representative of 1 of 4 independent experiments, each using a different RASf line. \* =  $P < 0.05$  versus control.



omin was still able to suppress the induction of VEGF mRNA in response to hypoxia (Figure 5A). In Matrigel implants containing RA fibroblasts and 10 nM chetomin, both significantly reduced cell infiltration and significantly reduced angiogenesis were observed (Figure 5B).

Similarly, specific targeting of HIF-1 $\alpha$  by lentiviral siRNA transduction of RA fibroblasts was able to reduce both HIF-1 $\alpha$  accumulation and induction of VEGF mRNA expression (Figure 5C). Matrigel implants containing HIF-1 $\alpha$  siRNA-transduced RA fibroblasts showed significant reductions in both cell infiltration and angiogenesis compared with that in control siRNA-transduced fibroblasts (Figure 5D).

## DISCUSSION

The potential contribution of synovial fibroblasts to chronic inflammation has been long recognized (15–17). Under the influence of exogenous microbial products, cytokines, or other proinflammatory stimuli, they can release a variety of mediators, such as cytokines, chemokines, or matrix metalloproteinases, that contribute to inflammation and tissue damage. Previous observations suggest that RA synovial fibroblasts acquire an abnormal and heritable phenotype, which includes an enhanced ability to invade and destroy cartilage and a perturbed expression of cytokines or chemokines (33–35). Our results show that in the absence of additional stimuli, and under hypoxic conditions *ex vivo*, fibroblasts in the setting of inflammatory arthritis induce the recruitment of myeloid cells and the development of blood vessels, a capacity previously observed in cancer stroma, with wide implications in the perpetuation of chronic inflammation (11,36,37).

Multiple potentially chemotactic factors have been found to be overexpressed by inflammatory fibroblasts, and this could contribute to leukocyte recruitment (35,38). Increased constitutive VEGF expression partly explains the observed inflammatory fibroblast phenotype. The strong effect of the VEGF antagonist not only in angiogenesis but also in myeloid cell recruitment supports the local relevance of this factor as the prime mover of these processes. Local and systemic levels of VEGF have been found to be increased in RA, and plasma VEGF levels are rapidly down-regulated by effective therapies (18–20). However, increased VEGF expression has not been described previously in cultured RA fibroblasts, possibly due to the use of OA fibroblasts, and not healthy fibroblasts, as controls (25). Interestingly, both OA and RA fibroblasts were characterized by an enhanced proangiogenic capacity, pointing to the

possibility of a common response occurring in chronic inflammatory stroma, rather than a disease-specific process. OA is considered a milder inflammatory disease, but significant inflammation and vascular remodeling also seem to contribute to joint destruction (39,40).

Although CXCL12 was not overexpressed by inflammatory fibroblasts, the antagonist of its specific CXCR4 receptor was also able to down-regulate cell recruitment and angiogenesis. Therefore, both VEGF and CXCL12 fibroblast-derived factors seem required for the recruitment of myeloid cells and angiogenesis. In a transgenic model of organ-specific VEGF/CXCL12 overexpression, both factors have shown complementary roles in the recruitment and retention of perivascular myeloid cells necessary for the angiogenic response (14). We have previously identified CXCL12 as one of the factors responsible for the angiogenic activity in RA synovial fluid (26). The results of previous studies showing that myofibroblastic differentiation was associated with increased CXCL12 expression explain the enhanced angiogenic response of some cancer fibroblasts (8). Although fibroblasts are the main source of CXCL12 in RA synovium, we did not find a correlation between increased constitutive CXCL12 expression, myofibroblast differentiation, and the proangiogenic capacity of inflammatory fibroblasts, which is consistent with the results of previous studies (25,26,41). Therefore, the pathologic differentiation of fibroblasts seems heterogeneous and can lead to a proangiogenic phenotype through different molecular pathways. In different cancer types, stable overexpression of platelet-derived growth factor or fibroblast growth factor type 2 have also been found to contribute to angiogenesis (42,43).

Deletion of HIF-1 $\alpha$  in cells of the myeloid lineage in murine models of inflammation has been shown to reduce cell infiltration as a result of metabolic changes that may limit the myeloid cell migratory capacity (44). VEGF and CXCL12 function as HIF transcriptional targets under hypoxic conditions (13,45), providing an additional link between hypoxia and inflammatory cell infiltration. Our results show that the response of resident cells to hypoxia is also critical to the recruitment of inflammatory cells through the synthesis of chemotactic and proangiogenic factors such as VEGF. Therefore, targeting of HIF-mediated responses could also revert the contribution of stromal fibroblasts to chronic arthritis perpetuation. In our model, both inhibition of HIF transcriptional activity and specific siRNA targeting of HIF expression had similar effects. A large variety of HIF-targeting compounds have been described, but none of these compounds has demonstrated

sufficient specificity (46). In our experimental model, we used the small molecule chetomin, which is the most potent HIF/P300 transcriptional inhibitor, when tested at nanomolar pharmacologic and noncytotoxic concentrations, identified so far (32). Although it lacks nonspecific transcriptional effects, the specificity and additional biologic activities of chetomin have not been thoroughly evaluated.

Current targeted therapies for RA are directed against T cells, B cells, or macrophage cytokines, and all reduce macrophage and lymphoid cell infiltration of the synovial membrane to a similar extent (47–49). However, within a short time after therapy withdrawal, the disease almost invariably relapses. Despite the remission of inflammation and cell infiltration, a hyperplastic stroma with an expanded vascular bed may remain, and this is correlated with further damage to the bone and cartilage tissue (22,50–52). Therapies specifically targeted to fibroblasts or vascular responses are not available for RA. Targeting stromal cell-derived proangiogenic factors and targeting HIF transcriptional responses represent alternative approaches to reduce the contribution of fibroblasts to the chronic inflammatory response.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. F. J. Blanco and M. J. López-Armada (Hospital Juan Canalejo, Madrid, Spain) and members of the Servicio de Traumatología (Hospital 12 de Octubre) for providing the synovial tissue samples, Dr. J. C. Segovia (CIEMAT, Madrid, Spain) for providing the lentiviral vectors, Dr. P. M. Chumakov (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH) for providing the HIF-1 $\alpha$  siRNA vector, and Dr. J. C. Ramírez (CNIC, Madrid, Spain) for help with the lentiviral methods.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Pablos had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study conception and design.** Santiago, Galindo, Pablos.

**Acquisition of data.** Del Rey, Izquierdo, Caja, Usategui, Santiago, Galindo, Pablos.

**Analysis and interpretation of data.** Del Rey, Izquierdo, Caja, Usategui, Pablos.

## REFERENCES

- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12877–82.
- Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol* 2005;26:150–6.
- Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 2006;25:989–1001.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006;25:977–88.
- Xia Y, Pauza ME, Feng L, Lo D. RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation. *Am J Pathol* 1997;151:375–87.
- Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2001;107:305–15.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332–7.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335–48.
- Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, et al. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med* 2007;357:2543–51.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194–201.
- Du R, Lu KV, Petrutsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, et al. HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008;13:206–20.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721–32.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858–64.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175–89.
- Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007;9:223.
- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 2007;315:1006–10.
- Armaka M, Apostolaki M, Jacques P, Kontoyiannis DL, Elewaut D, Kollias G. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med* 2008;205:331–7.
- Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:635–43.
- Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF $\alpha$  therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001;19:163–96.
- Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1521–9.
- Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:834–8.
- Canete JD, Pablos JL, Sanmarti R, Mallofre C, Marsal S, Maymo

- J, et al. Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1636–41.
23. Falchuk KH, Goetzel EJ, Kulka JP. Respiratory gases of synovial fluids: an approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1970;49:223–31.
24. Treuhaft PS, McCarty DJ. Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases. *Arthritis Rheum* 1971;14:475–84.
25. Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002;46:2587–97.
26. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, et al. Synovocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2003;170:2147–52.
27. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008;68:4331–9.
28. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;72:8463–71.
29. Razorenova OV, Ivanov AV, Budanov AV, Chumakov PM. Virus-based reporter systems for monitoring transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Gene* 2005;350:89–98.
30. Karhausen J, Kong T, Narravula S, Colgan SP. Induction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits HIF-1 expression. *J Cell Biochem* 2005;95:1264–75.
31. Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, et al. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 2006;281:951–61.
32. Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 2004;6:33–43.
33. Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996;149:1607–15.
34. Tolboom TC, van der Helm-Van Mil AH, Nelissen RG, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1999–2002.
35. Pierer M, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U, et al. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol* 2004;172:1256–65.
36. Ahn GO, Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell* 2008;13:193–205.
37. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell* 2008;13:181–3.
38. Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Canas I, Palao G, Galindo M, et al. Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:416–22.
39. Walsh DA, Wade M, Mapp PI, Blake DR. Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. *Am J Pathol* 1998;152:691–702.
40. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2173–7.
41. Santiago B, Baleux F, Palao G, Gutierrez-Canas I, Ramirez JC, Arenzana-Seisdedos F, et al. CXCL12 is displayed by rheumatoid endothelial cells through its basic amino-terminal motif on heparan sulfate proteoglycans. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R43.
42. Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 2008;5:e19.
43. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 2009;15:21–34.
44. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112:645–57.
45. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604–13.
46. Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 2006;4:601–5.
47. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity* 2008;28:440–4.
48. Canete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmarti R, et al. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-TNF- $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008 May 21. E-pub ahead of print.
49. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 2008;67:917–25.
50. Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marme D, Feldmann M, Maini RN, et al. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2055–64.
51. Kruithof E, De Rycke L, Vandooren B, De Keyser F, FitzGerald O, McInnes I, et al, on behalf of the OMERACT Special Interest Group on Synovial Analysis in Clinical Trials. Identification of synovial biomarkers of response to experimental treatment in early-phase clinical trials in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1795–804.
52. Taylor PC, Steuer A, Gruber J, Cosgrove DO, Blomley MJ, Marsters PA, et al. Comparison of ultrasonographic assessment of synovitis and joint vascularity with radiographic evaluation in a randomized, placebo-controlled study of infliximab therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1107–16.



# Immature Blood Vessels in Rheumatoid Synovium Are Selectively Depleted in Response to Anti-TNF Therapy

Elena Izquierdo<sup>1\*</sup>, Juan D. Cañete<sup>2\*</sup>, Raquel Celis<sup>2</sup>, Begoña Santiago<sup>1</sup>, Alicia Usategui<sup>1</sup>, Raimon Sanmarti<sup>2</sup>, Manuel J. del Rey<sup>1</sup>, José L. Pablos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Unitat d'Artritis, Servei de Reumatologia, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

## Abstract

**Background:** Angiogenesis is considered an important factor in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis (RA) where it has been proposed as a therapeutic target. In other settings, active angiogenesis is characterized by pathologic, immature vessels that lack periendothelial cells. We searched for the presence of immature vessels in RA synovium and analyzed the dynamics of synovial vasculature along the course of the disease, particularly after therapeutic response to TNF antagonists.

**Methodology/Principal Findings:** Synovial arthroscopic biopsies from RA, osteoarthritis (OA) and normal controls were analyzed by double labeling of endothelium and pericytes/smooth muscle mural cells to identify and quantify mature/immature blood vessels. To analyze clinicopathological correlations, a cross-sectional study on 82 synovial biopsies from RA patients with variable disease duration and severity was performed. A longitudinal analysis was performed in 25 patients with active disease rebiopsied after anti-TNF- $\alpha$  therapy. We found that most RA synovial tissues contained a significant fraction of immature blood vessels lacking periendothelial coverage, whereas they were rare in OA, and inexistent in normal synovial tissues. Immature vessels were observed from the earliest phases of the disease but their presence or density was significantly increased in patients with longer disease duration, higher activity and severity, and stronger inflammatory cell infiltration. In patients that responded to anti-TNF- $\alpha$  therapy, immature vessels were selectively depleted. The mature vasculature was similarly expanded in early or late disease and unchanged by therapy.

**Conclusion/Significance:** RA synovium contains a significant fraction of neoangiogenic, immature blood vessels. Progression of the disease increases the presence and density of immature but not mature vessels and only immature vessels are depleted in response to anti-TNF $\alpha$  therapy. The different dynamics of the mature and immature vascular fractions has important implications for the development of anti-angiogenic interventions in RA.

**Citation:** Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Santiago B, Usategui A, et al. (2009) Immature Blood Vessels in Rheumatoid Synovium Are Selectively Depleted in Response to Anti-TNF Therapy. PLoS ONE 4(12): e8131. doi:10.1371/journal.pone.0008131

**Editor:** Carol Feghali-Bostwick, University of Pittsburgh, United States of America

**Received:** September 30, 2009; **Accepted:** November 12, 2009; **Published:** December 2, 2009

**Copyright:** © 2009 Izquierdo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (FIS 05/060 and RETICS program, RD08/0075, RIER), Spain. EI was supported by predoctoral training program from Fondo de Investigación Sanitaria. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: jlpablos@h12o.es

These authors contributed equally to this work.

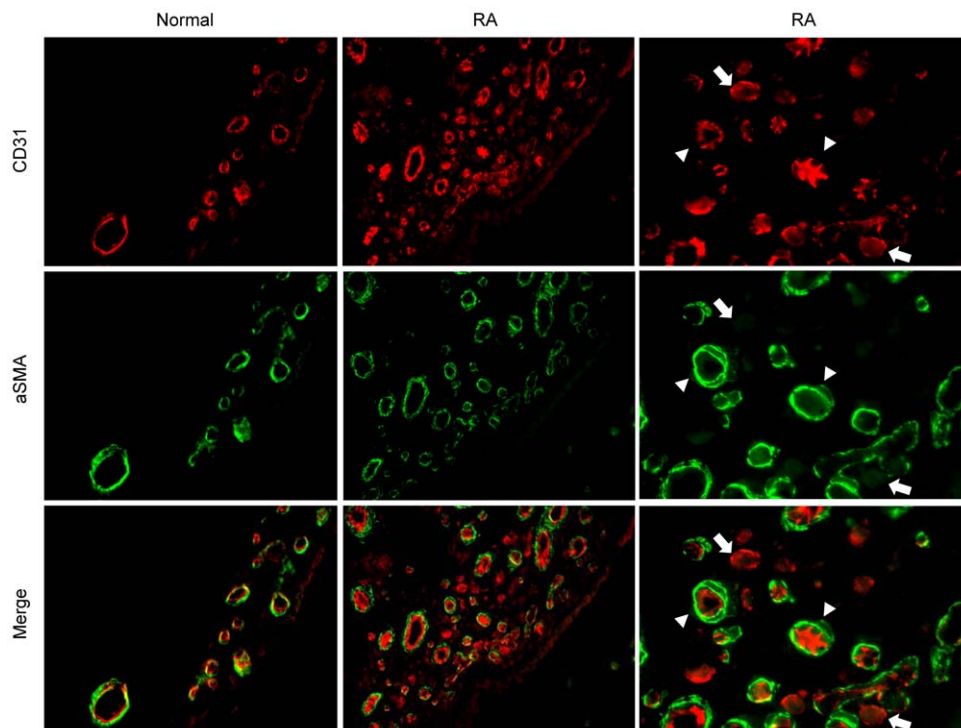
## Introduction

Increased synovial vascularity and biomarkers of angiogenesis have been described in different chronic arthritic diseases [1–6]. Multiple inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and growth factors produced in excess in the synovial environment can directly or indirectly mediate inflammatory angiogenesis [5–7]. One of the key mediators of the inflammatory angiogenic response is vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF can be induced by hypoxia and cytokines in synovial macrophages and fibroblasts [5–9]. Local and systemic levels of VEGF have been found increased in rheumatoid arthritis (RA) and correlate with active and severe disease [8–12]. In the collagen induced arthritis murine model, different VEGF antagonists have consistently shown remarkable therapeutic effects, pointing to angiogenesis as a valid therapeutic target [13–15]. However, detailed morphological studies of the changes in vascularity or vascular structure in arthritic tissues after therapy are lacking in this model. VEGF is

also an important regulator of vascular permeability and participates in myeloid cell migration and function [16–18]. Therefore, its antagonists might also improve arthritis by down-regulating these processes, also highly relevant to the pathogenesis of arthritis

VEGF mediated pathological angiogenesis has been extensively analyzed in cancer, where VEGF antagonists have reached clinical use and benefit patients with advanced malignancies [19]. Cancer angiogenesis is characterized by morphologically abnormal, immature, dilated and leaky vessels, which decrease effective tumour perfusion and contribute to tumour development by multiple mechanisms [20,21]. These VEGF induced immature vessels lack proper periendothelial coverage by pericytes or smooth muscle cells (SMC). VEGF mediates endothelial proliferation while inhibiting pericyte and SMC development, a process instead dependent on platelet derived growth factor (PDGF) signalling [22,23]. Selective depletion of immature vessels has been demonstrated after VEGF targeting in animal models of cancer,





**Figure 1. Detection of immature or mature blood vessels in RA synovial tissues.** Double immunofluorescent labeling of endothelium (CD31, red fluorescence) and pericytes/smooth muscle cells (aSMA, green fluorescence) in normal and RA synovial tissue is shown. Original magnification  $\times 400$ . Right panels show the same area as in middle panels with higher magnification. Mature CD31+ vessels covered by aSMA+ periendothelial cells are marked by arrows, and immature CD31+ vessels lacking aSMA+ mural cells by arrow heads.  
doi:10.1371/journal.pone.0008131.g001

whereas mature vessels are relatively stable and resistant to VEGF antagonists [20–24]. VEGF inhibition retards tumour progression by complex effects in vascular functions, including improved effective tumour perfusion and changes in inflammatory cell and fluid influx [22–25].

Similar to tumours, in RA synovium, a severely hypoxic environment is maintained despite active angiogenesis and enhanced vascularity, suggesting abnormal function of the neoangiogenic vessels [26,27]. However, the presence of immature synovial vessels or their potential contribution to the disease process has not been investigated. Improvement of the disease in response to anti-TNF therapy is paralleled by a dramatic reduction in local or systemic VEGF and other angiogenesis markers [10–12,28,29]. Imaging techniques suggest that increased vascularity and oedema are reduced by effective therapy [30–32]. Persistent vascular activity correlates with further damage to bone and cartilage tissues even in patients on clinical remission.

Therefore, analyzing changes in vascular structure and density after the indirect VEGF down regulation that occurs in response to anti-TNF- $\alpha$  therapy might be informative on the potential role of neoangiogenic vessels in the pathogenesis of RA.

We have specifically analyzed the pericyte/endothelial structure of RA synovial vessels and whether changes in vascular density or maturity correlate with clinicopathological progression of the disease. Furthermore, we longitudinally analyzed potential changes in the vascular structure in response to effective therapy in a series of patients treated with TNF- $\alpha$  antagonists for active disease.

## Methods

### Ethics Statement

All patients signed a written informed consent. The present study was approved by the institutional ethical committees of both participating centers (Ethical Committee of the Hospital Clinic of

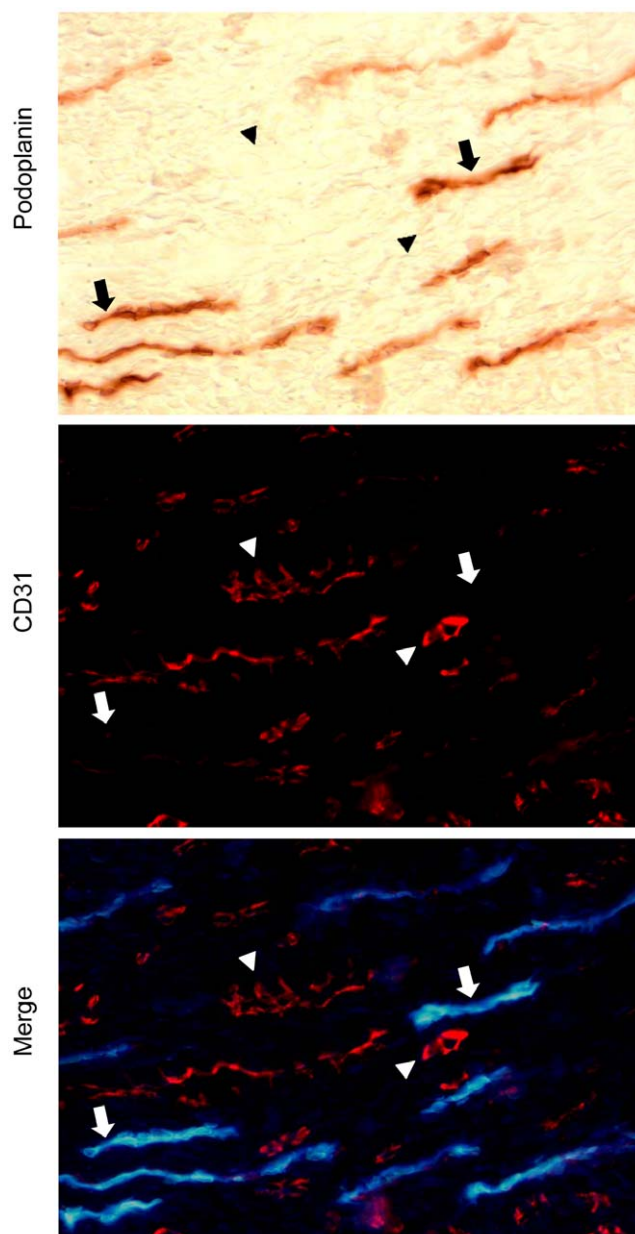
**Table 1. Mature and Immature Vessels in RA, OA or Normal Synovial Tissues.**

	RA n=82	OA n=14	Normal n=4	p-value*
CD31+/aSMA+ Vessels/mm <sup>2</sup>	294 $\pm$ 95	74 $\pm$ 28	94 $\pm$ 44	<0.0001
CD31+/aSMA- Vessels/mm <sup>2</sup>	26 $\pm$ 27	0.6 $\pm$ 1.2	0 $\pm$ 0	<0.0001
Total Vessels/mm <sup>2</sup>	319 $\pm$ 98	74.5 $\pm$ 28	94 $\pm$ 44	<0.0001
Proportion of tissues with CD31+/aSMA- vessels (%)	66/82(80%)	3/14(21%)	0/4(0%)	<0.0001

CD31+/aSMA+: Mature vessels; CD31+/aSMA-: Immature vessels; Total vessels represents the sum of both mature and immature vessels.

(\*) RA versus OA.

doi:10.1371/journal.pone.0008131.t001



**Figure 2. Double labeling of lymphatic and CD31-positive vessels in RA synovial tissues.** Lymphatic vessels were detected by immunoperoxidase (brown immunostaining) detection of podoplanin and double immunofluorescent labeling (red fluorescence) of CD31. The same field was photographed by light or fluorescent microscopy to show the position of CD31+ (arrowheads) and podoplanin+ vessels (arrows). Light microscopy image was inverted and merged with CD31 fluorescent image of the same field to show the relative position of podoplanin (blue) and CD31 (red) labeling. doi:10.1371/journal.pone.0008131.g002

Barcelona, Barcelona, and Clinical Research Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain).

### Patients and Synovial Biopsies

Arthroscopic synovial tissue biopsies were obtained from the knee of 82 patients fulfilling the American Rheumatism Association revised criteria for RA. All patients had active disease characterized by inflammation of at least one knee joint. Patients characteristics at biopsy, including age, sex, disease duration, 28-

joint Disease Activity Score (DAS28), C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate (ESR), presence of IgM rheumatoid factor (RF) (positive  $\geq 30$  IU/ml) or anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) as determined by second-generation enzyme-linked immunosorbent assay (positive  $\geq 50$  IU/ml, Immunoscan, Stockholm, Sweden), and the presence of erosions were recorded.

A subgroup of 25 patients that started an anti-TNF- $\alpha$  therapy (etanercept, adalimumab or infliximab) at first biopsy due to active disease refractory to previous DMARD therapy (mean DAS28 score  $6.0 \pm 1.4$ ), underwent a second biopsy after  $10 \pm 2$  months of anti-TNF- $\alpha$  therapy. All these patients also received DMARD therapy with methotrexate (7.5–20 mg/week) and 60% low dose prednisone ( $\leq 5$  mg/day). Arthroscopic biopsies were obtained for research purposes as previously described [33]. The rate of side effects of arthroscopy was very low and restricted to delayed wound healing of one of the portals of entry in one patient ( $< 1\%$ ). After arthroscopy, lavage and steroid injection were performed and usually followed by rapid improvement of arthritic pain.

Control synovial tissues from 14 osteoarthritic (OA) synovial tissues were obtained by synovectomy at prosthetic joint replacement surgery. In addition, normal (non-inflammatory) synovial tissues were obtained from 4 individuals lacking previous joint disease at elective arthroscopic surgery for minor traumatic lesions. Lack of inflammatory infiltration in these tissues was confirmed by histological examination.

### Immunofluorescent Labelling of Synovial Vessels

Tissues were deparaffinized, rehydrated and microwave heated in pH 9 EDTA for antigen retrieval. Double immunofluorescent labeling of endothelium and periendothelial pericytes/smooth muscle cells was performed by sequential incubation with anti-CD31 (JC70A clone, Dako, Carpinteria, CA, USA) and anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (aSMA) (1A4 clone, Sigma Aldrich Química, Madrid, Spain) monoclonal antibodies, and isotype specific Alexa 488 and Alexa 594 labeled secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR). Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immunoperoxidase staining of T-cells, B-cells, macrophages and PNAd+ high-endothelial venules (HEV) was performed and quantified as previously described [33]. Lymphoid neogenesis was defined by the presence of grade 2–3 T/B cell aggregates containing HEV as described [33].

For lymphatic vessels, immunoperoxidase labeling was performed with anti-podoplanin mAb (D2/40 clone, Dako) and avidin-biotin immunoperoxidase secondary reagents (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and developed by diaminobenzidine chromogen. Double lymphatic and CD31 labeling was performed by simultaneous podoplanin immunoperoxidase and CD31 immunofluorescent detection as indicated above.

The whole area of each tissue was photographed and digitalized using a Spot RT CCD camera and Spot 4.0.4 software (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan) on a Zeiss Axioplan-2 fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). The number of blood vessels per area was determined by two independent observers blind to the origin and characteristics of each biopsy. Interobserver correlation coefficient for CD31+/aSMA- number of vessels was  $r = 0.75$  ( $p < 0.0001$ , Spearman's test). The proportion of labeled/unlabeled synovial tissue area was also analyzed in digitalized images using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### Statistical Analyses

For cross-sectional analyses, quantitative variables were compared by Mann Whitney U test or ANOVA (Kruskal Wallis test)

where appropriate. Correlation between different numerical variables was analyzed by Spearman's test. Changes in quantitative variables before and after anti-TNF therapy were tested with Wilcoxon's signed rank test for paired data. Bonferroni correction was applied for the correction of multiple testing.

## Results

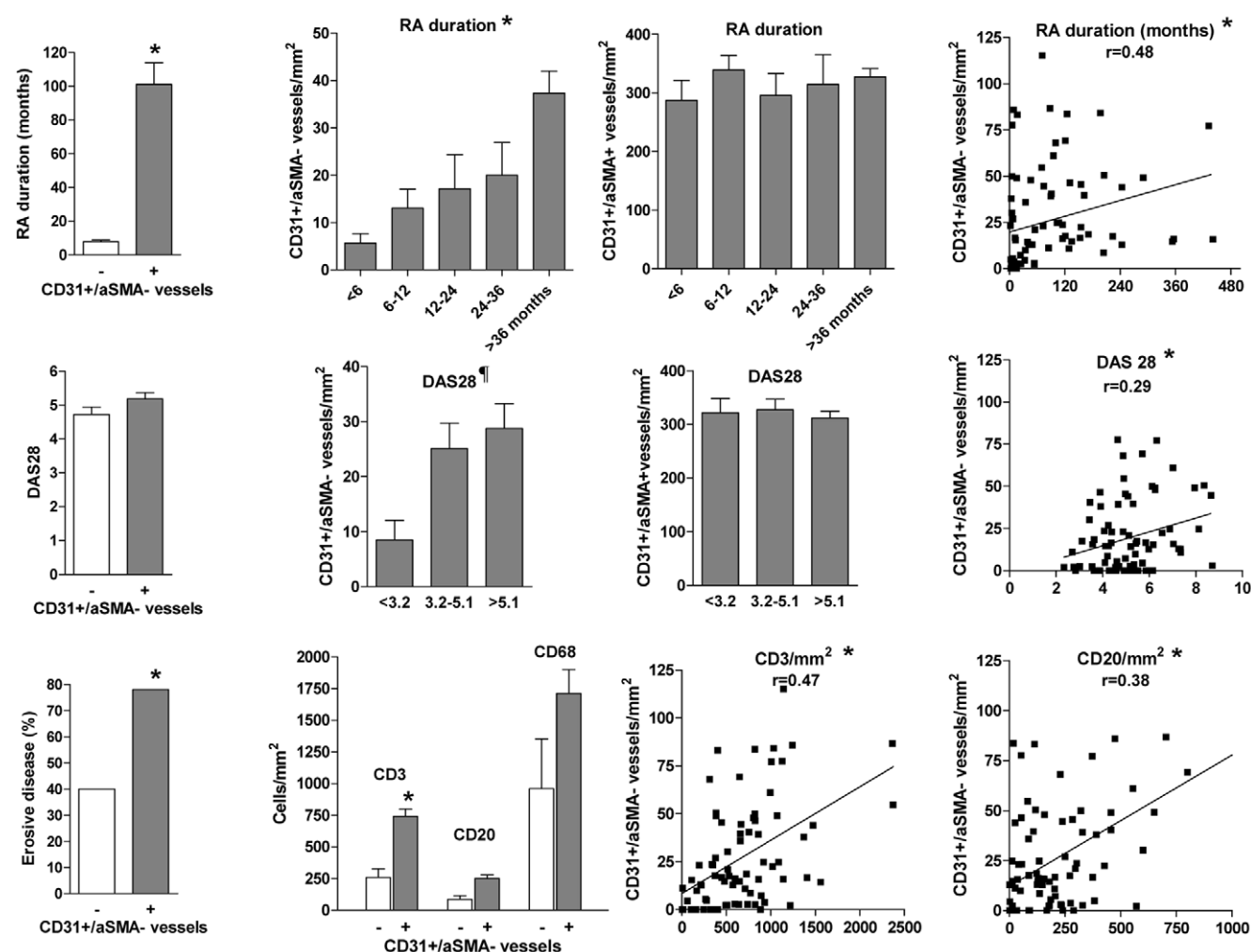
### Vascularity and Immature aSMA-Negative Blood Vessels in RA Synovial Tissues

By double labelling of endothelium (CD31) and pericyte/smooth muscle cells (aSMA) immature, CD31-positive vessels lacking aSMA-positive periendothelial cells, and mature CD31-positive vessels covered by aSMA-positive mural cells were identified in RA synovial tissues (Figure 1). Most RA tissues (66/82) contained a variable number of immature CD31+/aSMA- vessels, whereas they were only present in a small proportion of OA tissues at a significantly lower density, and were not identified in normal synovial tissues (Table 1). RA immature vessels were predominantly small size vessels, preferentially located in sublining

areas containing abundant inflammatory infiltrates. Complete or partial concordance in the presence of immature vessels in different areas of the same joint was 30% and 53% respectively, whereas in 17% of the cases, only one area contained immature vessels.

The fractional CD31-positive and aSMA-positive areas and the total number of mature vessels per area were also significantly increased in RA tissues compared to OA and normal tissues (Table 1). Although both determinations are not equivalent, since labelled area depends on number and size of vessels, statistically significant correlation was confirmed between manually acquired quantitative data on CD31- or aSMA-positive vessels per area and the fractional CD31- or aSMA-positive area evaluated by digital image analysis ( $r=0.35$ ,  $p=0.001$  and  $r=0.31$ ,  $p=0.002$  respectively).

Weak CD31 labelling has occasionally been found in lymphatic vessels of different tissues [34]. Although erythrocytes could be observed in some immature vessels lumen by light phase contrast microscopy (data not shown), to formally exclude that increased lymphatics in RA could explain the presence of CD31 vessels



**Figure 3. Clinicopathological correlations of immature blood vessels in RA synovial tissues.** Disease duration, DAS28 score, erosive disease, and synovial tissue infiltration by CD3, CD20 or CD68 cells is shown in groups with (+) or without (-) immature vessels as indicated. Density of mature or immature vessels in patients stratified by disease duration and levels of activity (low: DAS28 < 3.2, moderate 3.2–5.1, or high > 5.1). Spearman's correlation coefficients between immature vessels density and disease duration, DAS28, CD3 or CD20 infiltration are shown. (\*)  $p < 0.05$  (see text). ¶  $p = 0.04$  (Kruskal Wallis test and post hoc Dunns test (low versus moderate or high activity groups)). doi:10.1371/journal.pone.0008131.g003



lacking aSMA-positive periendothelial cells, we performed double CD31 and lymphatic (podoplanin) immunolabelling. Podoplanin was detected by peroxidase immunohistochemistry due to lower sensitivity of immunofluorescent labelling. Podoplanin immunoperoxidase and CD31 immunofluorescent labelling were mutually exclusive, therefore confirming that in RA synovial tissues, CD31+/aSMA- were immature blood vessels (Figure 2).

### Clinicopathological Correlations of Immature Blood Vessels in RA Synovial Tissues

Our RA patients represented a non-selected cross-sectional sample, heterogeneous in terms of disease duration, and demographic, clinical and analytical characteristics. We analysed whether selected characteristics of the disease, particularly disease duration and several markers of activity or severity, were correlated with the presence or abundance of immature vessels in synovial tissue (Table 2). The presence of immature vessels was significantly associated to a significantly longer disease duration ( $101 \pm 104$  versus  $7.8 \pm 3.6$  months;  $p < 0.0001$ ; Table 2; Figure 3). The density of immature blood vessels was also significantly and positively correlated with the duration of the disease ( $p = 0.003$ ; Figure 3). In contrast, the mature vascular density did not correlate with disease duration (Figure 3). The different density of immature and mature vessels stratified by different disease duration segments is shown in Figure 3.

Disease activity at biopsy as evaluated by DAS28 score was slightly higher in patients with synovial immature vessels ( $5.2 \pm 1.5$  versus  $4.7 \pm 0.8$ ; Table 2 and Figure 3) but the difference did not reach statistical significance. The density of immature vessels was significantly lower in low versus moderate and high disease activity groups as shown in Figure 3 ( $p = 0.04$ ). The density of immature blood vessels was also significantly and positively correlated with the DAS28 score ( $p = 0.009$ ; Figure 3). Mature vascular density was not correlated with disease activity.

The presence of erosive disease at the time of biopsy was significantly higher in the group of patients with synovial immature vessels (78% versus 40%;  $p = 0.0039$ ; Table 2). Stratification by sex, age, presence or absence of RF or ACPA

auto-antibodies, did not show differences in the presence or density of immature vessels nor in mature vascular density in the different groups (Table 2).

Synovial inflammation was also quantified as the density of cellular infiltration by macrophages, T-cells, B-cells, or their organization into lymphoid aggregates characterized as lymphoid neogenesis (LN) as previously described (33). Correlation between these parameters and the presence or density of immature vessels was analysed. Tissues containing immature vessels contained a higher density of T and B-cells and macrophages (Table 2; Figure 3). A significant correlation between the density of T-cells ( $p < 0.0001$ ) but not sublining macrophage infiltration and the density of immature vessels was found (Figure 3). Density of B-cells and the presence of LN structures were higher in tissues with immature vessels but after correction for multiple testing the difference was non-significant. No significant correlation between mature vascular density and cell infiltration by any cell type or LN structures was found.

### Effects of Anti-TNF Therapy on Mature and Immature Blood Vessels

To evaluate whether the structure or abundance of immature vessels was modified by therapy and whether these changes correlate with changes in the clinical course of the disease induced by therapy, we analysed a subgroup of 25 patients rebiopsied after anti-TNF $\alpha$  therapy. Clinical and synovial cellular changes in response to therapy in this group of patients are shown in Table 3.

After therapy, a significant improvement in DAS28 scores was observed, as well as a significant decrease in T-cell and macrophage cell infiltration, and a non-significant decrease in B-cell infiltration (Table 3). Seven patients had not responded, and 6 and 12 had obtained moderate and good EULAR responses to anti-TNF- $\alpha$  therapy at the time of the second biopsy [35].

A statistically significant decrease in the number of CD31+/aSMA- immature vessels was observed in biopsies obtained after anti-TNF- $\alpha$  therapy (Table 3). In contrast, the number of mature CD31+/aSMA+ vessels per mm<sup>2</sup> was not significantly modified after therapy (Table 3). Consistently, the fractional CD31 area was

**Table 2.** Clinicopathological data stratified by the presence of Immature Vessels (IV).

	All patients n = 82	IV- n = 16 (20%)	IV+ n = 66 (80%)	p-value*
Age (years)	58 $\pm$ 13	53 $\pm$ 10	59 $\pm$ 10	NS
Female (%)	68%	69%	68%	NS
RA duration (months)	83 $\pm$ 100	7.8 $\pm$ 3.6	101 $\pm$ 104	<0.0001
DAS28	5.1 $\pm$ 1.4	4.7 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 1.5	NS
CRP (mg/dl)	4.02 $\pm$ 3.43	3.08 $\pm$ 2.92	4.25 $\pm$ 3.50	NS
Erosive disease (%)	67%	40%	78%	0.0039
Auto-antibodies positive† (%)	71%	65%	72%	NS
CD3+ T-cells/mm <sup>2</sup>	667 $\pm$ 466	258 $\pm$ 239	742 $\pm$ 460	0.0002
CD20+ B-cells/mm <sup>2</sup>	226 $\pm$ 205	87 $\pm$ 98	251 $\pm$ 211	NS¶
CD68+ cells/mm <sup>2</sup>	1643 $\pm$ 1326	990 $\pm$ 1037	1729 $\pm$ 1336	NS
LN (%)	48%	29%	52.4%	NS¶
Mature Vessels/mm <sup>2</sup>	294 $\pm$ 95	279 $\pm$ 111	298 $\pm$ 92	NS

Data represent baseline data recorded at the time of biopsy. IV: immature CD31+/aSMA- vessels. LN: lymphoid neogenesis; DAS28: disease activity score; CRP: C-reactive protein; NS: Non-significant.

(\*)IV- versus IV+ groups.

(†)RF or ACPA auto-antibodies.

(¶)p<0.05 but NS after correction for multiple testing.

doi:10.1371/journal.pone.0008131.t002

**Table 3.** Clinicopathological changes in patients after anti-TNF $\alpha$  therapy.

	Basal Biopsy	Post Anti-TNF Biopsy	p-value	$\Delta$ Change Non-responders*	$\Delta$ Change Responders
DAS28	6.0 $\pm$ 1.4	3.9 $\pm$ 1.9	<0.0001	-0.5 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 1.8
CRP mg/dl	4.8 $\pm$ 3.5	1.6 $\pm$ 2.0	0.0004	1.0 $\pm$ 4.1	4.2 $\pm$ 3.6
CD31+/aSMA- vessels/mm <sup>2</sup>	52 $\pm$ 31	31 $\pm$ 27	0.017	-0.4 $\pm$ 13	12 $\pm$ 16
CD31 area (%)	3.1 $\pm$ 1.6	2.5 $\pm$ 1.4	0.03	-0.2 $\pm$ 2.1	0.9 $\pm$ 1.0
CD31+/aSMA+ Vessels/mm <sup>2</sup>	276 $\pm$ 82	321 $\pm$ 110	NS	30 $\pm$ 25	8 $\pm$ 59
aSMA+ area (%)	3.68 $\pm$ 1.6	3.60 $\pm$ 1.4	NS	-0.1 $\pm$ 1.9	0.1 $\pm$ 1.7
CD3/mm <sup>2</sup>	823 $\pm$ 88	478 $\pm$ 83	0.0064	202 $\pm$ 398	400 $\pm$ 698
CD20/mm <sup>2</sup>	322 $\pm$ 59	220 $\pm$ 54	NS	219 $\pm$ 245	56 $\pm$ 411
CD68/mm <sup>2</sup>	324 $\pm$ 38	192 $\pm$ 31	0.0091	53 $\pm$ 180	163 $\pm$ 195

CD31+/aSMA-: immature vessels. CD31+/aSMA+: mature vessels. p-value of basal versus post-anti-TNF values.

(\*)Absolute decrease from basal values in patients achieving moderate or good EULAR response (responders) and non responders to anti-TNF.

doi:10.1371/journal.pone.0008131.t003

significantly decreased after therapy whereas the aSMA area was not modified (Table 3). The relative decrease in immature vessels density was higher in patients obtaining better EULAR therapeutic responses ( $p=0.01$ ; Figure 4). Clinical and pathological changes in responders and non-responders are also shown in Table 3.

## Discussion

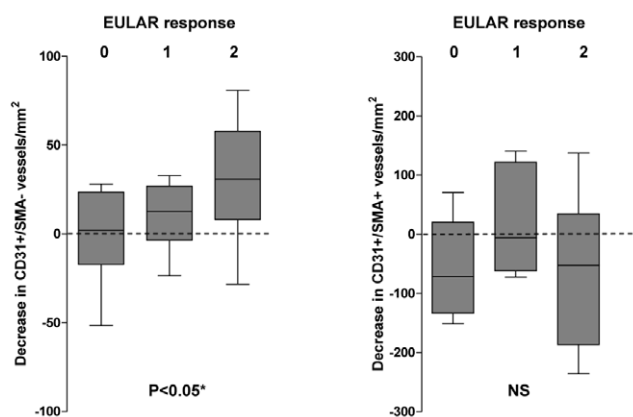
The presence of immature blood vessels is a phenomenon previously associated to cancer tissues or developmental processes where active angiogenesis takes place [21,36]. An imbalance between endothelial cell tube formation and the parallel development of pericytes has been mechanistically linked to VEGF-induced angiogenesis [23]. In RA, a severely hypoxic environment and possibly cytokines, induce Hif (hypoxia inducible factor) mediated transcriptional activation of VEGF and many other pro-angiogenic genes [10,26,27,37]. Excessive expression of VEGF in chronically inflamed RA synovial tissue is therefore one of the key factors explaining increased angiogenesis in the synovial membrane [5–9]. Consistently, we found abundant immature

blood vessels in the inflammatory RA tissue which represents the first description of this vascular abnormality in a human chronic inflammatory disease. Scanty immature vessels could also be detected in a few OA but not in normal synovial tissues. This suggests that active angiogenesis and the presence of immature vessels is not a disease-specific process but it is rather associated to the severity of inflammation. In OA, a less intense inflammatory process and active vascular remodelling are also variably present [2–4]. In a previous study we found that increased VEGF expression also characterizes OA synovial fibroblasts [38]. In RA, immature vessels seem to appear relatively early in the disease but as disease progresses their density increases, being maximal in long-standing, active, and erosive disease groups. The observed correlation between lymphocyte infiltration and immature vessels formation points to a possible link between both processes.

Among patients rebiopsied after anti-TNF- $\alpha$  therapy, immature vessels depletion was preferentially observed in those patients achieving good therapeutic responses. The important increase in mature vessels density observed in RA tissues seems present from the earliest phases and less susceptible to change. After anti-TNF- $\alpha$  therapy, the observed decrease in immature vessels was not paralleled by a reduction in mature vasculature. Consistently, only CD31 but not aSMA labelled area was decreased by anti-TNF- $\alpha$  therapy. These observations together with previous observations on the effect of therapy on local or systemic angiogenesis markers suggests that effective therapy halts active angiogenesis but has little effect on the expanded mature vascular bed [10,28,29].

In the most refractory patients, immature vascular development seems insufficiently targeted by anti-TNF- $\alpha$  therapies. Persistently enhanced vascularity after improvement of clinical inflammation can be a factor of chronicity and it has been associated to further progression of joint damage [30–32]. Whether the persistent vascular signal observed by imaging studies corresponds to resistant immature or to higher mature vascularity is not known. Parallel imaging and histological studies are needed to evaluate the contribution of persistent immature/mature vessels to disease progression and may illustrate the specific pathogenetic contribution of immature vessels.

In cancer tissues, specific anti-angiogenic anti-VEGF therapy has been found to induce selective changes in the immature vascular bed, a process called vascular normalization, where immature vessels selectively disappear [21,24]. This is consistent with the different sensitivity to VEGF depletion of immature and mature vessels. Whereas VEGF is required to sustain newly



**Figure 4. Variation in the density of immature vessels stratified by the levels of response to anti-TNF- $\alpha$  therapy.** Decrease in immature (left graphics) or mature (right graphics) vessels density between the first and second biopsy after anti-TNF- $\alpha$  therapy is shown stratified by EULAR responses: 0 = No response; 1: Moderate response; 2: Good response. (\*) Kruskal Wallis test and post hoc Dunns test (non-responders versus good responders). doi:10.1371/journal.pone.0008131.g004

formed vessels, this factor is dispensable for the mature vascular network [21]. Our data suggest that upon indirect VEGF down-regulation by anti-TNF- $\alpha$  therapy in RA [10–12], blood vessels normalization rather than global vascular reduction occurs, and suggests that VEGF antagonists might not be active on the largest fraction of the expanded synovial vascularity. In an animal model of airway inflammatory angiogenesis, VEGF independent angiogenic effects of TNF- $\alpha$  have also been identified, suggesting that alternative mediators may also be linked to the down-regulation of inflammatory angiogenesis induced by TNF- $\alpha$  blocking [39].

Although immature vessels depletion occurred preferentially in patients responding to anti-TNF- $\alpha$  therapy, the pleiotropic effects of this intervention do not permit to speculate on the role of immature vessels depletion in such response. In cancer, immature vessels are associated to increased permeability and high interstitial fluid pressure, decreasing the effective perfusion of the tissue and drug access, and modifying inflammatory cell infiltration [20–22,25].

The role of immature vessels in inflammation has only been explored in a murine model of Mycoplasma induced airway

inflammation [40]. In this model, enforced vascular immaturity by ephrinA2 deletion was directly linked to greater leukocyte infiltration and higher expression of inflammatory cytokines upon inflammatory challenge. Further studies on the specific contribution of immature blood vessels to RA pathogenesis are needed to understand the potential of more specific anti-angiogenic interventions for the therapy of RA.

## Acknowledgments

We are grateful to the Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica (Hospital 12 de Octubre) for providing control synovial tissues. We also thank David Lora (Unidad de Epidemiología Clínica, Hospital 12 de Octubre) for valuable help on statistical analyses.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EI JDC JLP. Performed the experiments: EI RC BS AU RS. Analyzed the data: EI JDC RC BS AU RS MJDR JLP. Wrote the paper: EI JDC RC BS AU RS MJDR JLP.

## References

1. FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Bresnihan B (1991) Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 50: 792–796.
2. Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C, Gomez-Vaquero C, Paessler ME, et al. (2008) The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Ann Rheum Dis* 67: 1184–7.
3. Giatromanolaki A, Sivridis E, Athanassou N, Zois E, Thorpe PE, et al. (2001) The angiogenic pathway “vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor” in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 194: 101–8.
4. Walsh DA, Wade M, Mapp PI, Blake DR (1998) Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. *Am J Pathol* 152: 691–702.
5. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, et al. (1994) Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 152: 4149–56.
6. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, et al. (1994) Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 180: 341–6.
7. Szekanecz Z, Koch AE (2007) Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3: 635–43.
8. Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G (1995) Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 22: 1624–30.
9. Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marme D, Feldmann M, et al. (2001) Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 2055–64.
10. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, et al. (1998) Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41: 1258–65.
11. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, et al. (2003) Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 1521–9.
12. Taylor PC (2005) Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy. *Rheumatology* 44: 721–8.
13. Miotla J, Maciewicz R, Kendrew J, Feldmann M, Paleolog E (2000) Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest* 80: 1195–205.
14. Lu J, Kasama T, Kobayashi K, Yoda Y, Shiozawa F, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164: 5922–7.
15. Afuwape AO, Feldmann M, Paleolog EM (2003) Adenoviral delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) abrogates disease activity in murine collagen-induced arthritis. *Gene Ther* 10: 1950–60.
16. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, et al. (2006) VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124: 175–89.
17. Zittermann SI, Issekutz AC (2006) Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. *J Leukoc Biol* 80: 247–57.
18. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, et al. (2006) Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 108: 1849–56.
19. Folkman J (2006) Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57: 1–18.
20. Ellis LM, Hicklin DJ (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 8: 579–91.
21. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159–65.
22. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, et al. (2008) Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* 453: 410–4.
23. Greenberg JL, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, et al. (2008) A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 456: 809–13.
24. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, et al. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10: 145–7.
25. Jain RK, Tong RT, Munn LL (2007) Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model. *Cancer Res* 67: 2729–35.
26. Muz B, Khan MN, Kiriakidis S, Paleolog EM (2009) Hypoxia. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11: 201.
27. Distler JH, Wenger RH, Gassmann M, Kurowska M, Hirth A, et al. (2004) Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 10–23.
28. Goedkoop AY, Kraan MC, Picavet DJ, de Rie MA, Teunissen MB, et al. (2004) Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study. *Arthritis Res Ther* 6: R326–34.
29. Cañete JD, Pablos JL, Sanmartí R, Mallofré C, Marsal S, et al. (2004) Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 1636–41.
30. Naredo E, Möller I, Cruz A, Carmona L, Garrido J (2008) Power Doppler ultrasonographic monitoring of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 2248–56.
31. Brown AK, Conaghan PG, Karim Z, Quinn MA, Ikeda K, et al. (2008) An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 2958–67.
32. Saleem B, Brown AK, Keen H, Nizam S, Freeston J, et al. (2009) Disease remission state in patients treated with the combination of tumor necrosis factor blockade and methotrexate or with disease-modifying antirheumatic drugs: A clinical and imaging comparative study. *Arthritis Rheum* 60: 1915–22.
33. Cañete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, et al. (2009) Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68: 751–6.
34. Baluk P, McDonald DM (2008) Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1131: 1–12.
35. Fransen J, van Riel PL (2005) The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol* 23 (Suppl 39): S93–9.
36. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: 3047–55.

37. Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lytle D, et al. (2002) Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46: 2587–97.
38. Del Rey MJ, Izquierdo E, Caja S, Usategui A, Santiago B, et al. (2009) Synovial inflammatory fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a HIF1 $\alpha$ /VEGF mediated pathway. *Arthritis Rheum* 60: 2926–34.
39. Baluk P, Yao LC, Feng J, Romano T, Jung SS, et al. (2009) TNF- $\alpha$  drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice. *J Clin Invest*. [Epub ahead of print].
40. Okazaki T, Ni A, Baluk P, Ayeni OA, Kearley J, et al. (2009) Capillary defects and exaggerated inflammatory response in the airways of EphA2-deficient mice. *Am J Pathol* 174: 2388–99.

## **SYNOVIAL FIBROBLAST HYPERPLASIA IN RHEUMATOID ARTHRITIS: CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS AND PARTIAL REVERSAL BY ANTI-TUMOR NECROSIS FACTOR THERAPY**

Elena Izquierdo<sup>1\*</sup>, Juan D. Cañete<sup>2\*</sup>, Raquel Celis<sup>2</sup>, Manuel J. Del Rey<sup>1</sup>, Alicia Usategui<sup>1</sup>, Sara Marsal<sup>3</sup>, Raimon Sanmartí<sup>2</sup>, Gabriel Criado<sup>1</sup>, José L. Pablos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Elena Izquierdo, MSc, Manuel J. Del Rey, PhD, Alicia Usategui, MSc, Gabriel Criado, PhD, José L. Pablos, MD, PhD. Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid (Spain). <sup>2</sup>Juan D. Cañete, MD, PhD, Raquel Celis, PhD, Raimon Sanmartí, PhD. Unitat d'Artritis, Servei de Reumatologia, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona (Spain). <sup>3</sup>Sara Marsal, PhD. Unitat de Reumatologia i Grup de Recerca de Reumatologia. Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron. Barcelona (Spain).

(\*)These authors contributed equally to this work.

Corresponding autor: Dr Jose L. Pablos, Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, 28041 Madrid (Spain). E-mail: [ilpablos@h12o.es](mailto:ilpablos@h12o.es). Phone 34-91-3908766. Fax 34-91-3908544.

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria, grant numbers: PI08/0316, PI08/206 and RETIC RD08/0075 (RIER). EI and GC were supported by Fondo de Investigación Sanitaria

Short title: Anti-TNF- $\alpha$  reduces synovial fibroblast hyperplasia

## ABSTRACT

**Objective:** Synovial fibroblasts (SF) hyperplasia has been proposed to contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) but quantitative information on this process is scarce. The aims of this study were to evaluate the fibroblast specific marker hsp47 as a quantitative marker for SF and analysing its clinicopathological correlates and evolution after anti-TNF- $\alpha$  therapy.

**Methods:** Synovial arthroscopic biopsies from 48 RA patients and 20 osteoarthritis (OA) or normal controls were analysed. 25 RA patients with active disease at biopsy were rebiopsied after anti-TNF- $\alpha$  therapy. Immunolabeling for hsp47, inflammatory cells, and vascular cell markers was performed. Hsp47-positive lining and sublining fractional areas were quantified and their correlation with clinicopathological variables analyzed.

**Results:** In normal and diseased synovial tissues, hsp47 was specifically and uniformly expressed by lining, sublining and perivascular fibroblasts. Lining SF area was significantly increased in both RA and OA compared to normal tissues. Sublining SF area was increased in RA compared to OA or normal tissues. Lining SF area was positively correlated with the density of macrophages, disease activity score (DAS28), and RA duration. In contrast, sublining SF area was negatively correlated with RA duration and activity. A significant reduction of lining but not sublining SF area was observed after anti-TNF- $\alpha$  therapy.

**Conclusion:** Hsp47 is a reliable marker to quantify SF in human synovial tissues. Our data suggest that lining and sublining SF undergo a different dynamics along the course of the disease. Lining SF expansion parallels

disease activity and progression and can be partially reversed by anti-TNF- $\alpha$  therapy.

## INTRODUCTION

Synovial fibroblasts (SF), also termed fibroblast-like or type B synoviocytes, are the most abundant resident cell type in human synovial tissue. In rheumatoid arthritis (RA) synovium, SF expansion may occur by either acquired growth advantages or the recruitment of variably differentiated precursors (1-4). Numerous evidences support the potential contribution of SF to the pathogenesis of chronic arthritis (5-6). SF respond to cytokines, remarkably TNF- $\alpha$ , by producing a large variety of inflammatory and tissue destructive mediators. In addition, arthritic SF display a constitutive pro-inflammatory phenotype that persists in tissue culture in the absence of exogenous stimuli (7-9). Both cytokine induced responses and constitutive changes often converge to common pathways that result in increased synthesis of chemokines, cytokines, pro-angiogenic factors, and factors related with increased invasiveness and tissue destruction (5-9). Therefore, the expansion of a SF pool with an abnormal phenotype could significantly contribute to chronic inflammation and destruction of the joints. Proof of this concept has been generated in animal models of arthritis, where specifically targeting fibroblasts TNF- $\alpha$  receptors is sufficient to preclude the development of TNF- $\alpha$  mediated arthritis (10). Interruption of cadherin-mediated SF cell-cell adhesions critical to lining and pannus formation has also shown to reduce severity of arthritis in mice (11).

SF hyperplasia has been morphologically described in the synovial lining and the cartilage invasive pannus (12-13). However, since no reliable markers for

SF are available, truly quantitative data on SF hyperplasia are scanty. The expression of different SF markers can be modified by the disease status and by the different location of SF in the synovium. Increased UDPGD, CD55 (decay-accelerating factor or DAF), VCAM and cadherin-11 expression in lining versus sublining SF has been reported, and the expression and distribution of these markers is variable in normal compared to RA synovium as well as in cultured SF exposed to cytokines (14-20). Fibroblast lineage markers such as prolyl-hydroxylases or Thy1 also show important sensitivity and specificity limitations (21-23). This paucity of specific phenotypic markers explains the lack of quantitative information on the potential changes of SF in relation with RA inflammatory activity or therapeutic responses.

The immunohistochemical detection of the collagen-specific chaperon hsp47 has recently been demonstrated as a highly specific and sensitive method to identify fibroblasts in human healthy or pathological tissues (23-24). Hsp47 is not expressed by macrophages, vascular or smooth muscle cells and, in fibroblasts, it is constitutive and not dependent on their activation status. We have confirmed the validity of this marker to quantify SF in synovial tissues and analysed the correlations between SF expansion and relevant clinicopathological variables in a series of RA patients. Our data suggest that lining but not sublining SF expansion is a dynamic component of RA synovitis that parallels inflammatory activity and disease progression, and that can be partially reversed in response to anti-TNF- $\alpha$  therapy.



## PATIENTS AND METHODS

### Patients and Synovial Biopsies

Arthroscopic synovial tissue biopsies were obtained from the knee of 48 patients fulfilling the American Rheumatism Association revised criteria for RA as previously described. All patients had active disease characterized by inflammation of at least one knee joint. Patient characteristics at biopsy, including disease duration, 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and the presence of autoantibodies (rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide) and erosions were recorded. The mean age of the patients was  $57 \pm 11$  years (range 25-80) and the mean disease duration  $76 \pm 104$  months (range 2-441) with 22 (46%) patients having early RA (<1 year).

All patients signed a written informed consent. The present study was approved by the institutional ethical committees of both participating centers (Ethical Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, and Clinical Research Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain).

A subgroup of 25 patients that started an anti-TNF- $\alpha$  therapy (etanercept, adalimumab or infliximab) after the first biopsy due to active disease refractory to previous methotrexate therapy (mean DAS28 score  $6.0 \pm 1.4$ ), underwent a second biopsy after  $10 \pm 2$  months of anti-TNF- $\alpha$  therapy plus methotrexate.

Control synovial tissues from 14 osteoarthritic (OA) synovial tissues were obtained by synovectomy at prosthetic joint replacement surgery. In addition, normal non-inflammatory synovial tissues were obtained from 6 individuals lacking previous joint disease at elective arthroscopic surgery for minor meniscal lesions. Lack of inflammatory changes in normal tissues was confirmed by histological examination.

## Immunolabeling of Synovial Cells and Tissues

Tissues were deparafinized, rehydrated and microwave heated in pH9 EDTA for antigen retrieval. Fibroblasts were immunolabeled with anti-hsp47 monoclonal antibodies (M16.10A1 clone, Assay Designs, MI, USA) and isotype specific Alexa 594 or Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR), or biotinylated secondary antibodies. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or haematoxylin. Immunoperoxidase staining and quantification of T-cells, B-cells and macrophages was performed as previously described (25).

Double labeling of endothelium was performed with anti-CD31 monoclonal antibody (JC70A clone, Dako, Carpinteria, CA, USA) as previously described (26). Double labeling of hsp47 and mononuclear cells was performed with anti-CD45 (2B11/PD7/26 clone, Dako) as pan-leukocyte marker, or anti-CD68 (KP1 clone, Dako) as macrophage marker.

The whole area of each tissue was photographed and digitalized using a Spot RT CCD camera and Spot 4.0.4 software (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan) on a Zeiss Axioplan-2 fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). The SF fractional area was quantified on anti-hsp47 Alexa 594 immunolabeled sections using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Since the lining area was directly dependent of the degree of SF hyperplasia, the hsp47-positive area in the lining was adjusted by the linear length (mm) of the analysed lining whereas the sublining hsp47-positive area was adjusted by the total area.

SF from synovial tissues of patients with RA or normal controls were obtained as previously described, cultured on glass coverslips after the third passage,

and immunolabeled for hsp47 using the same protocol as for synovial tissues (2). Parallel cultures treated or untreated with TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 24h were analyzed.

### Statistical Analyses

For cross-sectional analyses, quantitative variables were compared by Student's *t*-test. Correlation between different numerical variables was analyzed by Spearman's or Pearson's test where appropriate. Changes in quantitative variables after anti-TNF- $\alpha$  therapy were tested with Student's *t*-test for paired data.

## RESULTS

### Immunolabeling of SF in synovial tissues and tissue culture

In haematoxylin counterstained sections from healthy or diseased synovial tissues, anti-hsp47 immunolabeling showed a specific pattern that included abundant cells in the lining, fibroblast shaped cells in the sublining and some cells with a perivascular distribution, whereas mononuclear cell infiltrates were hsp47-negative (Figure 1). In RA hyperplastic lining hsp47 labelled cells tended to accumulate at the basal rather than the superficial layers consistently with the previously described distribution of UDPGD activity (14).

Cultured SF from either normal or RA tissues displayed a uniform cytoplasmic pattern of hsp47 labelling. No unlabelled cells were detected by DAPI counterstaining in SF cultures (Figure 2). Pretreatment of SF cultures with TNF- $\alpha$  did not modify the pattern nor the relative intensity of immunofluorescent labeling per cell compared to untreated cells (Figure 2).

By double labelling, neither lining nor sublining macrophages (CD68-positive) were labeled by anti-hsp47 (Figure 1). Double labelling with the pan-leukocyte marker CD45 and hsp47 were mutually exclusive, ruling out hsp47 labelling of all lymphoid and myeloid cell types. To better identify hsp47 labelled perivascular cells, double labeling for hsp47 and endothelial cells with anti-CD31 was performed. Perivascular fibroblasts or pericytes of small vessels but not endothelial cells were hsp47-positive (Figure 1). In larger blood vessels of deeper areas, perivascular fibroblasts but not smooth muscle cells were labeled by anti-hsp47 mAb (data not shown). Intensity of labeling was uniform and similar for lining, sublining and perivascular fibroblasts.

The density and distribution of hsp47-labeled SF in normal or diseased tissues was variable. In healthy synovial tissues, a single layer of alternating SF and non-fibroblastic cells was observed in the lining (Figure 1). In OA and RA tissues, an increased proportion of hsp47-positive SF was observed, arranged in several layers towards the basal lining area. Lining hsp47-positive fractional area was significantly increased in either RA or OA tissues compared to normal tissues but no significant differences between OA and RA were found (Figure 1). In RA, sublining hsp47-positive area was significantly increased compared to either OA or healthy tissues and significant differences between OA and normal tissues were not found (Figure 1).

### **Clinicopathological correlations of SF hyperplasia**

Lining and sublining SF area was highly variable between different RA individuals, heterogeneous in terms of disease duration and RA activity or severity. We therefore analysed whether clinical activity (DAS28), disease

duration, density of inflammatory cell infiltration (CD68, CD3, CD20), and CD31 blood vessels were correlated with the observed increase of lining or sublining SF areas (Table 1). The lining SF area was significantly and positively correlated with the density of infiltration by CD68-positive macrophages in the sublining, a validated parameter for inflammatory activity (27). No statistically significant correlation with lymphocytic infiltration by T- or B-cells or vascularity was found.

The DAS28 clinical activity score was significantly correlated with the lining SF area. The duration of the disease before arthroscopy was also significantly correlated with the lining SF area. A progressive increase in the lining SF area was observed from the earliest phases of the disease (Figure 3). To confirm this correlation, we compared the lining SF area in early (<1 year) versus late disease groups. The mean lining SF area was also significantly higher in the late compared to the early disease group (Figure 3).

The area of sublining SF was increased from the earliest phases of the disease, compared to OA or healthy controls, and significantly decreased with longer disease duration (Figure 3). Early disease group (<1 year) had a higher sublining SF area compared to late disease group (Figure 3). Contrarily to lining, sublining SF area was negatively correlated with DAS28 (Table 1). No other significant correlations between sublining SF area and other clinicopathological characteristics were found.

Significant differences in the lining or sublining SF area in patients stratified by erosive disease at biopsy, or by the presence of rheumatoid factor or aCCP autoantibodies were not found (data not shown).

### Changes in SF hyperplasia after anti-TNF- $\alpha$ therapy

In a subgroup of 25 patients, sequential biopsies were performed before initiating anti-TNF- $\alpha$  therapy for inadequate response to DMARD and  $10 \pm 2$  months later, when 18 (72%) patients had achieved a good or moderate EULAR response and 7 (28%) had not responded. Additional clinical and pathological changes induced by anti-TNF- $\alpha$  therapy in this series have previously been reported (26).

In the whole group of anti-TNF- $\alpha$  treated patients, a significant reduction in lining SF area was observed in the second biopsy, whereas sublining fibroblasts remained unchanged after anti-TNF- $\alpha$  therapy (Figure 4). The decrease in lining SF after anti-TNF- $\alpha$  therapy was observed in both responder (achieving good or moderate EULAR response) and non-responder groups. A trend towards a higher decrease in responders was observed but it did not reach statistical significance (Figure 4). Sublining SF remained similarly unchanged by anti-TNF- $\alpha$  therapy in both responders and non-responders (Figure 4). Neither basal lining nor sublining SF area predicted DAS28 change or EULAR response to anti-TNF- $\alpha$  therapy (data not shown).

Analysis of correlations between the decrease in lining SF and the change in other clinicopathological parameters also showed a positive but non-significant trend for CD3 T-cells, CD68 sublining macrophages, and CRP, but not for CD20 B-cells, vascularity (CD31) or DAS28 (Table 2).

## DISCUSSION

During the past decades, numerous evidences point to RA SF as active drivers of synovial inflammation and joint destruction (3-8). Most studies

describe the gene expression and phenotypic changes in RA SF that explain their transition from normal connective tissue cell components with synthetic functions to pro-inflammatory and destructive cells. Lining hyperplasia has long been described in RA, OA and other inflammatory conditions as the best evidence for SF expansion (12, 28). Lining thickness variation correlates with activity and can decrease after effective therapy (12, 29-31). However, most cells in this area are macrophages and therefore, the reduction may also be due to a decrease in macrophages (28, 30). In the sublining, where interactions between lymphocytes and SF seem important (32-33), changes in SF have not been described. Our study confirms the utility of hsp47 immunolabeling as a useful fibroblast lineage marker in synovial tissues. This marker permits to obtain quantitative data on both lining and sublining SF fractions that can be correlated with clinical and therapeutic changes.

Our analysis shows that both SF pools are significantly expanded even at the earliest RA stages compared with normal synovial tissues. However, we found important differences between both SF subpopulations. Whereas lining SF hyperplasia tended to increase with time and inflammatory activity, the opposite was true for sublining SF. Furthermore, lining SF hyperplasia was not specific of RA and it was similar to what observed in end stage OA tissues, consistently with previous observations (28). In contrast, sublining SF hyperplasia was a RA specific feature that was not observed in OA tissues. Therefore, lining and sublining SF seem to follow a different dynamics in both diseases. Previous studies had shown that differences between lining and sublining SF in the expression of some SF factors such as cadherin-11, VCAM or DAF (CD55) are lost in RA, where a more homogeneous phenotype is observed (14-17). This

may be due to the inducible expression of these markers in SF by proinflammatory mediators such as TNF- $\alpha$  (18-20). This inflammatory transformation of sublining in lining-like SF together with their inverse balance along disease course suggests that spatial accumulation of SF in the lining and proinflammatory phenotype could be related processes.

The possibility of specific targeting of the stromal cell component in arthritis has only been explored in animal models, where all evidences are consistent with a relevant contribution of SF to the inflammatory and joint destructive process (10-11). The indirect effects of available RA therapies on SF hyperplasia had not been confirmed possibly because of the aforementioned limitations to obtain quantitative data (29-31). The effects of TNF- $\alpha$  antagonists are of particularly interest, since TNF- $\alpha$  is not only a critical factor in the proinflammatory and tissue destructive response of SF but also a proliferative and survival factor for SF (1-3, 10). We provide evidence of a significant reduction in lining but not sublining SF in response to anti-TNF- $\alpha$  therapy. However, we could not confirm the parallelism between this change and the clinical response. This is likely due to the small number of non-responder patients. Alternatively, the observed reduction in non-responders might also be explained by subclinical therapeutic effects. Joint protective effects of anti-TNF- $\alpha$  therapy have previously been demonstrated even in the absence of a clinical response (34). Therefore, the significance of the observed decrease in lining SF hyperplasia after therapy remains unclear. The mechanisms may relate to changes in the balance between proliferation and survival or to a reduction in the recruitment of precursors. We failed to detect an increased SF apoptotic rate in biopsies of anti-TNF- $\alpha$  treated patients but this could be due to the very



low rate of detectable apoptotic events in SF compared to lymphoid infiltrates or endothelium (unpublished observations). Nevertheless, the observed decrease in lining SF after therapy is only partial even in responders. Lining SF remain significantly increased in this group compared to normal synovium. The prognostic significance of persistent SF hyperplasia should be addressed by further longitudinal studies.

In summary, we provide evidence of the utility of hsp47 immunolabeling as a fibroblast marker in synovial tissues that may facilitate further studies on this important cell component in arthritis. Our data demonstrate differential changes in the lining and sublining SF compartments consistent with a different dynamics along the disease course and in response to anti-TNF- $\alpha$  therapy.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica (Hospital 12 de Octubre) for providing control synovial tissues. We also thank Vanessa Miranda for excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46:507-13.
2. Palao G, Santiago B, Galindo M, Paya M, Ramirez JC, Pablos JL. Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2803-10.

3. Li X, Makarov SS. An essential role of NF-kappaB in the "tumor-like" phenotype of arthritic synoviocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:17432-7.
4. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*. 2009;15:1414-20.
5. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233:233-55.
6. Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:669-75.
7. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*. 1996;149:1607-15.
8. Del Rey MJ, Izquierdo E, Caja S, Usategui A, Santiago B, Galindo M, et al. Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2926-34.
9. Buckley CD, Filer A, Haworth O, Parsonage G, Salmon M. Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis*. 2004;63 Suppl 2:ii92-ii95.
10. Armaka M, Apostolaki M, Jacques P, Kontoyiannis DL, Elewaut D, Kollias G. Mesenchymal cell targeting by TNF- $\alpha$  as a common pathogenic

principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med*. 2008;205:331-7.

11. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*. 2007;315:1006-10.

12. Rooney M, Condell D, Quinlan W, Daly L, Whelan A, Feighery C, et al. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:956-63.

13. Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum*. 1983;26:472-8.

14. Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worrall JG, Edwards JC. Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum*. 1992;35:1179-84.

15. Wilkinson LS, Edwards JC, Poston RN, Haskard DO. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovium. *Lab Invest*. 1993;68:82-8.

16. Hamann J, Wishaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 1999;42:650-8.

17. Edwards JC, Leigh RD, Cambridge G. Expression of molecules involved in B lymphocyte survival and differentiation by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 1997;108:407-14.

18. Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. *Vascular cell*

adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 1992;149:1424-31.

19. Croft D, McIntyre P, Wibulswas A, Kramer I. Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. *Am J Pathol.* 1999;154:1149-58.

20. Vandooren B, Cantaert T, ter Borg M, Noordenbos T, Kuhlman R, Gerlag D, et al. Tumor necrosis factor alpha drives cadherin 11 expression in rheumatoid inflammation. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3051-62.

21. Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Haustein UF, Anderegg U, et al. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol.* 2004;172:3850-9.

22. Jurisic G, Iolyeva M, Proulx ST, Halin C, Detmar M. Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Exp Cell Res.* 2010.

23. Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J, Collier HA. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 2008;56:347-58.

24. Kuroda K, Tajima S. HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Cutan Pathol.* 2004;31:241-6.

25. Cañete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmartí R, et al. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-

tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:751-6.

26. Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Santiago B, Usategui A, Sanmarti R, et al. Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy. *PLoS One*. 2009;4:e8131.

27. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:834-8.

28. Athanasou NA, Quinn J, Heryet A, Puddle B, Woods CG, McGee JO. The immunohistology of synovial lining cells in normal and inflamed synovium. *J Pathol*. 1988;155:133-42.

29. Kruithof E, De Rycke L, Roth J, Mielants H, Van den Bosch F, De Keyser F, et al. Immunomodulatory effects of etanercept on peripheral joint synovitis in the spondylarthropathies. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3898-909.

30. Smith MD, Kraan MC, Slavotinek J, Au V, Weedon H, Parker A, et al. Treatment-induced remission in rheumatoid arthritis patients is characterized by a reduction in macrophage content of synovial biopsies. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40:367-74.

31. Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP. Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2155-62.

32. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived

factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2001;107:305-15.

33. Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E, Exley AE, Parsonage G, Rainger GE, et al. Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2472-82.

34. Smolen JS, Han C, Bala M, Maini RN, Kalden JR, van der Heijde D, et al. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1020-30.

**Table 1.** Clinicopathological correlations of SF area in RA tissues\*

	Lining SF area		Sublining SF area	
	p-value	r	p-value	r
<b>CD3/mm<sup>2</sup></b>	0,751	0,05	0,695	-0,06
<b>CD20/mm<sup>2</sup></b>	0,890	-0,02	0,675	-0,06
<b>CD68SL/mm</b>	<b>0,017</b>	0,38	0,922	0,02
<b>CD31 vessels/mm<sup>2</sup></b>	0,078	0,25	0,662	0,06
<b>CRP</b>	0,088	0,30	0,089	-0,25
<b>DAS28</b>	<b>0,039</b>	0,24	<b>0,041</b>	-0,30
<b>Disease duration (months)</b>	<b>0,013</b>	0,36	<b>0,003</b>	-0,43

\* Spearman's or Pearson's tests.

**Table 2.** Correlations between changes in lining SF area and clinicopathological changes after anti-TNF- $\alpha$  therapy

	$\Delta$ Lining SF area*	
	p-value	r
$\Delta$ <b>CD3/mm<sup>2</sup></b>	0,082	0,35
$\Delta$ <b>CD20/mm<sup>2</sup></b>	0,601	0,08
$\Delta$ <b>CD68SL/mm</b>	0,071	0,36
$\Delta$ <b>CD31 vessels/mm<sup>2</sup></b>	0,452	-0,15
$\Delta$ <b>CRP</b>	0,067	0,37
$\Delta$ <b>DAS28 3v1</b>	0,177	0,27

\* $\Delta$  indicates basal minus post-anti-TNF value. Spearman's or Pearson's tests.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1. Hsp47 immunolabeling of RA and control synovial tissues.** Upper row panels shows immunoperoxidase (brown) anti-hsp47 labeling of lining and superficial sublining area in the different groups as indicated (x400 and haematoxylin counterstaining). Double immunofluorescent labeling of hsp47 (green) and CD31 (red) and merged images as indicated; arrows indicate perivascular hsp47-positive cells (DAPI nuclear counterstaining). Double immunofluorescent labeling of hsp47 (red) and CD68 (green) and merged images as indicated; arrows indicate the lining surface. Double immunofluorescent labeling of hsp47 (green) and CD45 (red) and merged images as indicated. Graphics show mean $\pm$ SE lining or sublining hsp47 fractional area in the different groups. Data are representative of 48 RA, 14 OA and 6 normal (N) tissues.  $p < 0.05$  RA or OA versus normal.

**Figure 2. Hsp47 immunolabeling of RA and control cultured synovial fibroblasts.** Fibroblasts from RA or normal controls were cultured on glass coverslips and immunolabeled (red) for hsp47. Parallel cultures were treated with TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 24h as indicated. Nuclear counterstaining with DAPI. Left panels show isotype control (CTRL) with or without DAPI nuclear counterstaining. Original magnification x400.

**Figure 3. Correlation between lining or sublining mean SF area and clinicopathological variables.** Individual hsp47 fractional areas are plotted against DAS28, disease duration, and density of CD68 macrophages as indicated. Statistical data are summarized in Table 1. Mean hsp47 positive



lining and sublining area stratified by disease duration <6, 6-12, 12-60 or >60 months as indicated. Lining SF  $p < 0.008$  early (<1 year) versus late (>1 year); Sublining SF  $p < 0.0001$  early (<1 year) versus late (>1 year). Data are representative of 48 RA patients.

**Figure 4. Changes in lining and sublining SF areas after anti-TNF- $\alpha$  therapy.** Immunofluorescent labeling (red) of hsp47 in lining and sublining areas in a single patient treated with anti-TNF- $\alpha$  (x400 and DAPI counterstaining). Graphics are representative of 25 patients. Pre: basal biopsy; Post: post-anti-TNF- $\alpha$  biopsy. Resp/Non Resp: groups of patients achieving or not a moderate or good EULAR response at second biopsy. \* $p < 0.03$  (Student's *t*-test for paired data).

Review

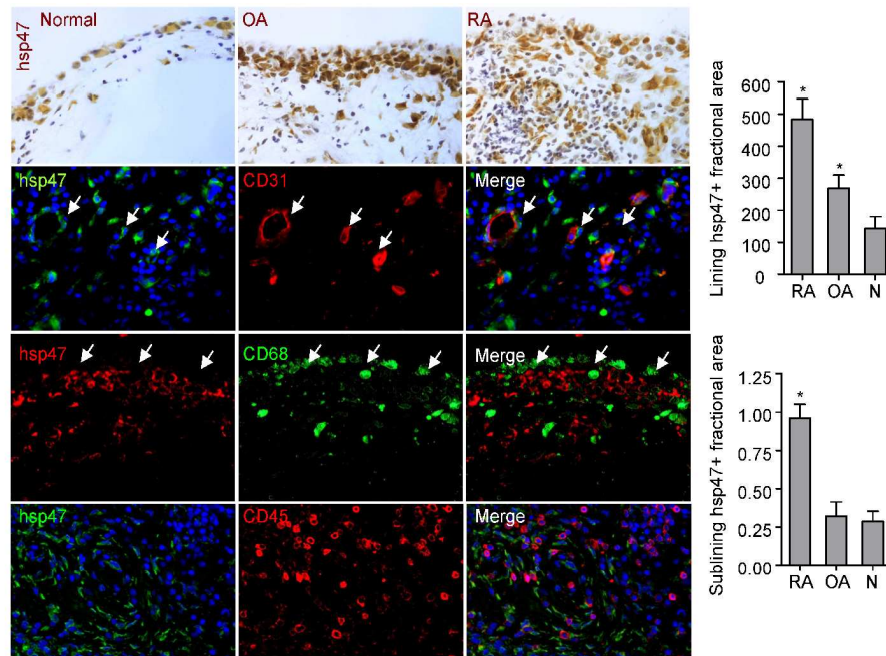


Figure 1. Hsp47 immunolabeling of RA and control synovial tissues. Upper row panels shows immunoperoxidase (brown) anti-hsp47 labeling of lining and superficial sublining area in the different groups as indicated (x400 and haematoxylin counterstaining). Double immunofluorescent labeling of hsp47 (green) and CD31 (red) and merged images as indicated; arrows indicate perivascular hsp47-positive cells (DAPI nuclear counterstaining). Double immunofluorescent labeling of hsp47 (red) and CD68 (green) and merged images as indicated; arrows indicate the lining surface. Double immunofluorescent labeling of hsp47 (green) and CD45 (red) and merged images as indicated. Graphics show mean  $\pm$  SE lining or sublining hsp47 fractional area in the different groups. Data are representative of 48 RA, 14 OA and 6 normal (N) tissues.  $p < 0.05$  RA or OA versus normal.

177x114mm (449 x 461 DPI)

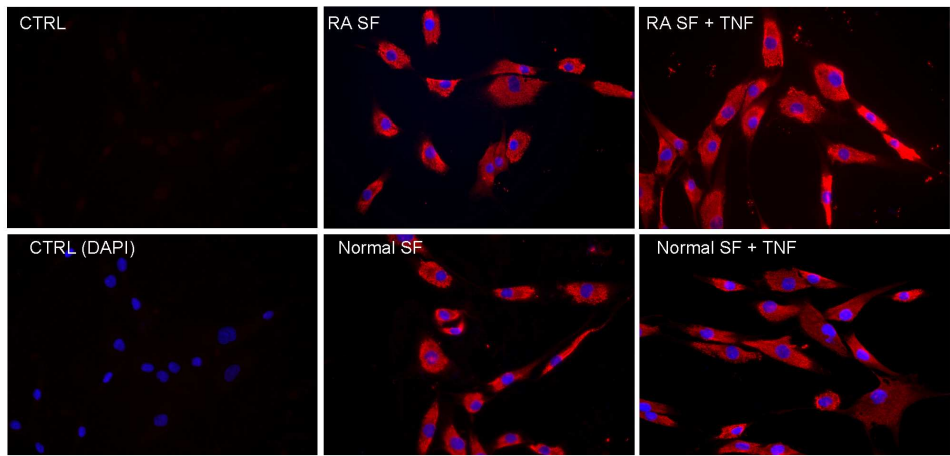


Figure 2. Hsp47 immunolabeling of RA and control cultured synovial fibroblasts. Fibroblasts from RA or normal controls were cultured on glass coverslips and immunolabeled (red) for hsp47. Parallel cultures were treated with TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 24h as indicated. Nuclear counterstaining with DAPI. Left panels show isotype control (CTRL) with or without DAPI nuclear counterstaining. Original magnification x400.  
177x114mm (300 x 301 DPI)

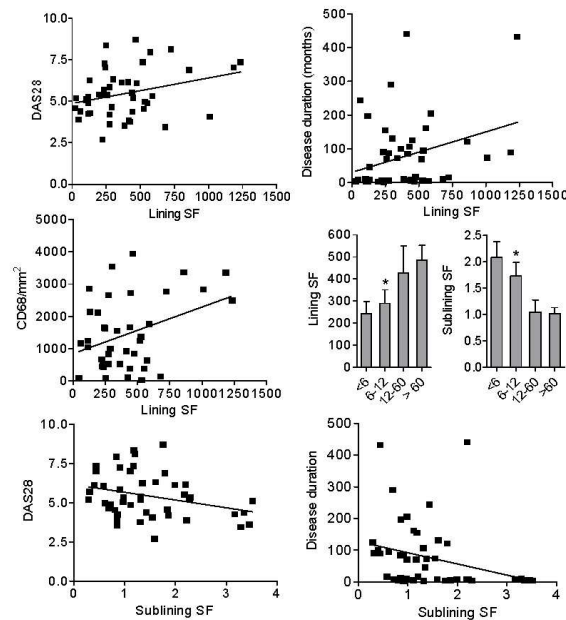


Figure 3. Correlation between lining or sublining mean SF area and clinicopathological variables. Individual hsp47 fractional areas are plotted against DAS28, disease duration, and density of CD68 macrophages as indicated. Statistical data are summarized in Table 1. Mean hsp47 positive lining and sublining area stratified by disease duration <6, 6-12, 12-60 or >60 months as indicated. Lining SF  $p < 0.008$  early (<1 year) versus late (>1 year); Sublining SF  $p < 0.0001$  early (<1 year) versus late (>1 year). Data are representative of 48 RA patients.

177x114mm (200 x 200 DPI)

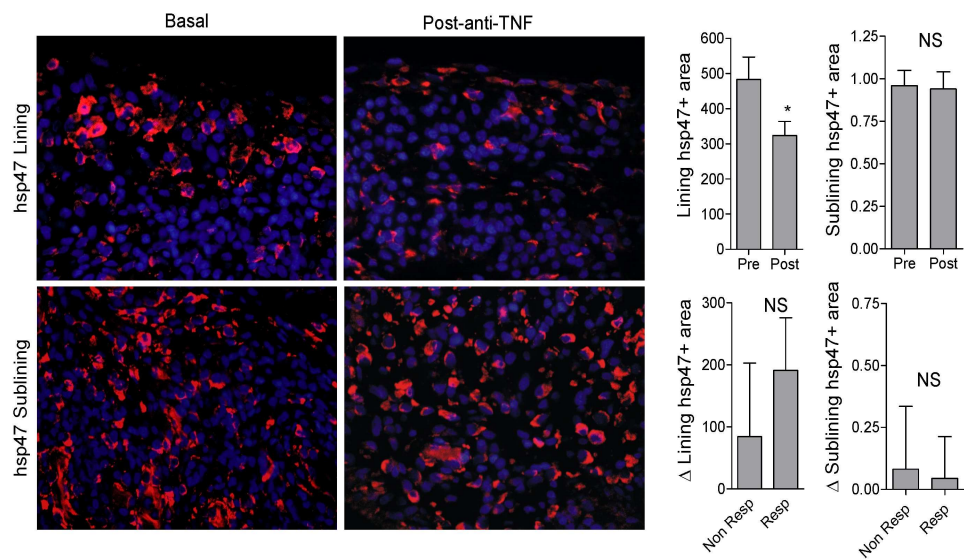


Figure 4. Changes in lining and sublining SF areas after anti-TNF- $\alpha$  therapy. Immunofluorescent labeling (red) of hsp47 in lining and sublining areas in a single patient treated with anti-TNF- $\alpha$  (x400 and DAPI counterstaining). Graphics are representative of 25 patients. Pre: basal biopsy; Post: post-anti-TNF- $\alpha$  biopsy. Resp/Non Resp: groups of patients achieving or not a moderate or good EULAR response at second biopsy. \* $p < 0.03$  (Student's t-test for paired data).  
177x114mm (411 x 446 DPI)



## **IX. OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS**

---





- Del Rey MJ, **Izquierdo E**, Usategui A, Gonzalo E, Blanco FJ, Acquadro F, Pablos JL. *The transcriptional response to hypoxia of normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum. 2010 Dec;62(12):3584-94
- Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, Gutiérrez-Cañas I, **Izquierdo E**, Usategui A, Galindo M, Alcamí J, Pablos JL. *CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts* Cytokine. Cytokine. 2010 Jul 5. In press.
- Cañete JD, Celis R, Moll C, **Izquierdo E**, Marsal S, Sanmartí R, Palacín A, Lora D, de la Cruz J, Pablos JL. *Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 2009 May; 68 (5):751-6.
- Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Stropoli I, Chow K, Levoe A, Laguri C, Sadir R, Delaunay T, **Izquierdo E**, Pablos JL, Lendinez E, Caruz A, Franco D, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. *The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins*. PLoS ONE. 2008 Jul 2; 3(7):e2543.



## **OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS**

- Del Rey MJ, **Izquierdo E**, Usategui A, Gonzalo E, Blanco FJ, Acquadro F, Pablos JL. *The transcriptional response to hypoxia of normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum. 2010 Dec;62(12):3584-94
- Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, Gutiérrez-Cañas I, **Izquierdo E**, Usategui A, Galindo M, Alcamí J, Pablos JL. *CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts* Cytokine. Cytokine. 2010 Jul 5. In press.
- Cañete JD, Celis R, Moll C, **Izquierdo E**, Marsal S, Sanmartín R, Palacín A, Lora D, de la Cruz J, Pablos JL. *Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 2009 May; 68 (5):751-6.
- Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Stathopoli I, Chow K, Levoe A, Laguri C, Sadir R, Delaunay T, **Izquierdo E**, Pablos JL, Lendinez E, Caruz A, Franco D, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. *The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins*. PLoS ONE. 2008 Jul 2; 3(7):e2543.

